

**Klinische Relevanz von p53-Protein als Prognosemarker  
bei urothelialen Karzinomen der ableitenden Harnwege**

**Retroprospektive Untersuchung an Patienten mit Urothelkarzinom**

**Ramana Saleh Birjandi**

**2007**

**Aus der Urologischen Abteilung des Klinikums München-Bogenhausen,  
städtisches Klinikum München GmbH  
Chefarzt: Professor Dr. med. A. Schilling**

**Klinische Relevanz von p-53-Protein als Prognosemarker  
bei urothelialen Karzinomen der ableitenden Harnwege**

**Retroprospektive Untersuchung an Patienten mit Urothelkarzinom**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität München**

**vorgelegt von  
Ramana Saleh Birjandi**

**aus**

**Shiraz**

**2007**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilian Universität München**

<b>Berichterstatter:</b>	<b>Professor Dr. med. A. Schilling</b>
<b>Mitberichterstatter:</b>	<b>Priv. Doz. Dr. D. Zaak</b>
<b>Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:</b>	<b>Frau Dr. med. U. Kaestner</b>
<b>Dekan:</b>	<b>Professor Dr. med. D. Reinhardt</b>
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>11.01.2007</b>

**Meinen Eltern**  
**In Gedanken und Dankbarkeit**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Glossar .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einteilung und Rechtfertigung der Studie .....</b>	<b>7</b>
1.1. Das Harnblasenkarzinom .....	7
1.2. BCG- Therapie und Prognose .....	8
1.3. Bekannte Risiken für das Blasenkarzinom .....	9
1.4. Tumor-Suppressor-Gene .....	11
1.5. Fragestellung und Untersuchungsziele .....	12
<b>2. Grundlagen zur experimentelle Studie und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1. Patientendaten .....	13
2.1.1. Dateneigenschaften .....	13
2.2. Tumormaterial .....	14
2.3. Methoden .....	14
2.3.1. Farbliche Nachweismethode .....	14
2.3.2. Auswertung der p53-Färbung .....	14
2.3.3. Statistikmethoden und Berechnungen .....	15
2.3.4. Auswertungen und Aussagen .....	15
<b>3. Ergebnisse aus den ausgewerteten Stammdaten .....</b>	<b>16</b>
3.1. Häufigkeit der p53-Expression im gesamten Patientenkollektiv .....	16
3.2. Die Korrelation zwischen Tumor-Marke und Rezidivhäufigkeit .....	16
3.4. Abhängigkeit von Therapie und Rezidivhäufigkeit bei P53- (p53-Negativ) .....	18
3.5. Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumorstadien bei P53 .....	18
3.6. Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und prozentualen Anteil der P53 .....	20
3.7. Abhängigkeiten zu Risikofaktoren (Rauch- und Alkoholkonsum) .....	20
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Literature-Verzeichnis .....</b>	<b>29</b>

## Glossar

A431	humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Positivkontrolle für p53)	n.e.	nicht enzymatisch
ATP	Adenosintriphosphat	NER	Nucleotide Excision Repair
BP	Benzo[a]pyren	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
B[g]C	Benzo[g]chrysen	PAH	Polyzyklische/r aromatischer/r Kohlenwasserstoff(e)
B[g]CDE	Benzo[g]chrysen-11, 12-dihydrodiol-13, 14-epoxid	PBS	Phosphate-gepufferte Saline
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9, 10-epoxid	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
BSA	Rinderserumalbumin	PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	RNA	Ribonukleinsäure
cEH	zytosolische Epoxidhydrolase	rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
Cip1	CDK-Interactin Protein 1	SDS	Natriumdodecylsulfat
dA	2'-Desoxyadenosin	SV40	Simian Virus 40
DB[a,l]P	Dibenzol[a]pyren	TBS	Tris-gepufferte Saline
DB[a,l]PDE	Dibenzol[a]pyren-11, 12-dihydrodiol-13, 14-epoxid	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
dC	2'-Desoxycytidin	U	Units (enzymatische Einheiten)
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser	WAF1	Wild-type p53 Activated Fragment 1
DE	Dihydrodiolepoxyd	XP	Xeroderma Pigmentosum
dG	2'-Desoxyguanosin		
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen		
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dT	(2'-Desoxy-)Thymin		
DTT	Dithiothreitol		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
ERCC	Excision Repair Cross Complementing		
FCS	Kälberserum (Fetal Calf Serum)		
GADD	Growth Arrest and DNA Damage Inducible		
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie		
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase		
mRNA	messenger-RNA		

# 1. Einteilung und Rechtfertigung der Studie

---

## 1.1. Das Harnblasenkarzinom

Im Bereich der ableitenden Harnwege ist die Blase eine der am häufigsten von malignen Tumorerkrankungen betroffenen Organen. In den westlichen Industrieländern liegt der Blasenkrebs bei Männern an fünfter Stelle auf der Liste der häufigsten Tumorarten. Frauen sind seltener betroffen<sup>180</sup>. In den USA sind Blasentumore für 4,5% aller neu auftretenden malignen Neoplasien verantwortlich und 1,9% aller Krebstodesfälle werden durch sie verursacht<sup>27</sup>. Bezogen auf die Gesamtheit der Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland rangiert das Blasenkarzinom bei Männern an fünfter Stelle, beide Geschlechter zusammen betrachtet an zehnter Stelle der Krebsmortalität<sup>207</sup>.

Das Maximum der Tumorinzidenz liegt zwischen der 5-ten und 7-ten Lebensdekade. Initialsymptom ist meist eine schmerzlose Hämaturie. Auch Dysurie und Pollakisurie werden berichtet, was nicht selten zur Fehldiagnose einer Zystitis führt. Bei Tumorwachstum im Bereich der Ureterostien kann es zusätzlich zu einer uni- oder bilateralen Harnstauung kommen. In Becken oder Beine ausstrahlende Schmerzen können Hinweis auf eine extravesikale Tumorausbreitung sein, auch Lymphabflussstörungen in diesem Gebiet sind bei ausgedehntem Befund möglich.

Nikotinexposition sowohl durch inhalatives Zigarettenrauchen als auch in der nikotinverarbeitenden Industrie konnte als wichtigste singuläre Ursache für die Entstehung von Blasentumoren nachgewiesen werden<sup>238</sup>. Daneben spielen auch weitere chemische Karzinogene wie aromatische Amine, Nitrosamine und verschiedene Aldehyde (z.B. Acrolein) als Auslöser eine wichtige Rolle<sup>210</sup>. Arbeiter in der chemischen Industrie sind diesen Substanzen in besonders hohem Maße ausgesetzt, wobei mit einer Latenz von 15-40 Jahren zwischen Karzinogenexposition und Tumorinzidenz zu rechnen ist<sup>41</sup>. Eine vorausgegangene Chemotherapie mit Cyclophosphamid<sup>62</sup>, Bestrahlungen im kleinen Becken<sup>54</sup>, Blasen-Bilharziose in der Anamnese, chronische Entzündungen im Urogenitaltrakt und der Phenacetinmetabolit N-Acetyl-p-Aminodiphenyl bei Schmerzmittelabusus sind weitere mögliche ätiologische Faktoren.

Bei mehr als 90% aller Blasentumoren handelt es sich histologisch um Karzinome des Übergangsepithels, wohingegen Plattenepithel-, Adeno- oder undifferenzierte Karzinome der Blase nur selten vorkommen. Umgekehrt betreffen 95% aller Urothelkarzinome die Harnblase, dagegen sind Ureter und Nieren weniger betroffen (2-3%). Liegt der Primärsitz des Urothelkarzinoms im oberen Harntrakt, wird in der Folge meist auch die Harnblase befallen<sup>107</sup>.

Diagnostisch wegweisend bei einer Tumorlokalisation im oberen Harntrakt ist die Ausscheidungsurographie (AUG), bei einem Sitz in der Harnblase die Zystoskopie mit gezieltem „Mapping“ der Schleimhaut. Auch exfoliative Urin- und/oder Spülzytologie sowie der Tumor-Marker NMP22 (Bladder-Check), können diagnostisch wegweisend sein. Im Blutlabor sind u.a. Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure von Interesse, auch Urinsediment und -status müssen kontrolliert werden. Obligate Untersuchungsmethoden bei begründeten Blasentumorverdacht sind ferner Sonographie, Computertomographie des Beckens und Abdomens, Röntgen-Thorax und Skelettszintigraphie.

In Bezug auf Wachstumsverhalten zeigt das Urothelkarzinom der Harnblase ein sehr variables Erscheinungsbild. 70-80% der Karzinome manifestieren sich in einem frühen Stadium als oberflächliche, meist papilläre Läsionen (pTa/pT1). In 20-30% der Fälle zeigt die Erkrankung bei Erstdiagnose bereits eine fortgeschrittene Invasion (pT2-pT4).

Oberflächliche Tumore zeichnen sich durch eine hohe Rezidivneigung aus, wohin bei nur ein Anteil von 10-20% zu einer fortschreitenden Infiltration der Blasenwand übergeht. Im Gegensatz hierzu weisen die primär fortgeschrittenen Karzinome ein hohes Risiko für eine Tumorprogression auf. Dies ist auch der Grund für die reduzierte 5-Jahres-Überlebensrate in dieser Gruppe, die trotz radikaler chirurgischer Intervention bei nur 50% liegt<sup>130</sup>.

Eine Sonderform der oberflächlichen Urothelkarzinome stellt das Karzinoma in situ (CIS) dar, welches sich flächenhaft an der Oberfläche entwickelt, ohne die Lamina propria mucosae zu infiltrieren. Es findet sich häufig in Begleitung von papillären Läsionen<sup>7,246</sup>.

Therapie der Wahl bei den oberflächlichen Urothelkarzinomen ist die transurethrale Resektion (TUR Blase). Abhängig von Tumor-Staging, -Grading, evtl. multifokalem Auftreten und Therapie rezidivieren 30-90% der oberflächlichen Tumore, wobei allerdings nur etwa 15-20% im weiteren Verlauf zur tieferen

Invasion neigen oder Metastasen setzen<sup>133</sup>. Daher wird meist eine adjuvante lokale Chemotherapie oder BCG-Immuntherapie als intravesikale Applikation (z.B. Bacille Calmette-Guérin) durchgeführt. Hierdurch gelang es, die Tumorprogressionsrate zu senken und die Langzeit-Überlebensrate zu erhöhen<sup>87,88</sup>.

Aufgrund des hohen malignen Potentials der primär fortgeschrittenen Urothelkarzinome (pT2-pT4) mit Neigung zu Rezidiven und Progression ist hier die Indikation zur radikalen Zystektomie gegeben. Je nach Tumordifferenzierung, lokaler Resektabilität und evtl. vorhandenen Metastasen kommt als Alternative die Chemo- und/oder integrierte Radiotherapie<sup>102,103</sup> in Betracht.

Tumor-Grad und Stadien sind ein wesentlicher Bestandteil in dieser klinischen Untersuchung. Die betreffenden Harnblasenkarzinome sind wie folgt klassifiziert und dargestellt:

- Gx: Differenzierungsgrad nicht bestimmt
- G1: gut differenziert
- G2: mäßig differenziert
- G3: schlecht differenziert
- G4: anaplastisch

Tumor-Stadien sind gemäß UICC-Klassifikation (modifiziert 2002, s. auch Abb.1) wie folgt unterteilt:

- Tx: Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0: kein Anhalt für Primärtumor
- Tis: Karzinoma in situ (CIS, „flat tumour“)
- Ta: nicht invasives papilläres Karzinom
- T1: Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
- T2: Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
- T3: Tumor infiltriert tiefste Muskulatur oder perivesikales Fettgewebe
  - 1) T3a: Tumor infiltriert tiefste Muskulatur (äußere Hälfte)
  - 2) T3b: Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
- T4: Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken- oder Bauchwand

#### Hinweis:

Der Zusatz (m) soll bei entsprechender Tumor-Kategorie verwendet werden, um auf multiple Läsionen hinzuweisen. Die pathologische Klassifikation wird mit dem vorangestellten Index „p“ gekennzeichnet.

## 1.2. BCG- Therapie und Prognose

Als gesichert kann die in mehreren prospektiven Studien nachgewiesene Wirksamkeit der BCG-Instillation zur Verminderung der Rezidivrate gelten<sup>86,123,150,173</sup>. Die BCG gilt zur Zeit als das wirksamste intravesikal applizierbare Agens zur Rezidivprophylaxe bei oberflächlich wachsenden Transitionalzellkarzinomen. Allerdings existiert zur Zeit weder ein einheitliches Therapieschema noch wurden in den unterschiedlichen Studien dieselben BCG-Stämme verwendet bzw. unterschiedliche Stämme hinsichtlich ihrer Wirksamkeit verglichen. Die BCG-Instillation führt zur lokalen Infiltration der Blasenschleimhaut mit immunkompetenten Zellen, wobei vor allem T4-Zellen einwandern und Makrophagen aktiviert werden<sup>25</sup>.

Bedingung für eine erfolgreiche Therapie des Resttumors ist dessen geringe Masse. Dies erklärt die besonders erfolgreiche Anwendung bei Tumoren im Stadium pTis, bei denen es in 50-70% der behandelten Fälle gelang, eine komplette Remission zu erreichen<sup>28,47,101,122,173</sup>. Diese Therapie geht jedoch mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen einher, die sich neben der lokal entzündlichen Reaktion, die sich durch Dysurie, Pollakisurie und Hämaturie äußert und vor allem als Folge der systemischen allergischen Reaktion auf die eingebrachten Antigene manifestiert. So kann es zu Fieber und einer grippeähnlichen Symptomatik, zu disseminierten Granulombildung vor allem in Leber und Lunge mit sekundärer lebensbedrohlicher bakterieller Superinfektion und sogar zur BCG-Sepsis kommen<sup>121</sup>. Deshalb darf diese Therapie bei immungeschwächten Patienten nicht durchgeführt werden.



Nicht abschließend kann zur Zeit der Versuch der Behandlung mit Zytokinen beurteilt werden, da die hierzu vorliegenden Studien mit zu kleinen Fallzahlen durchgeführt wurden. Erwähnenswert ist der lokale Therapieansatz mit Interferon-alpha, von dem in einigen Studien eine erfolversprechende Remissionsrate berichtet wird<sup>3,73,196</sup>. Ein Vorteil gegenüber der BCG-Therapie scheint vor allem in der wesentlich geringeren Nebenwirkungsrate zu liegen.

Ebenfalls ungeklärt ist bisher die Wirksamkeit des stark immunogen wirkenden „Keyhole limpet Hämözyanins“ (KLH), welches aus der Hämolymphe einer Napfschnecke gewonnen wird. KLH kann die Aktivität der natürlichen Killerzellen verbessern<sup>157</sup>. Bei einer Studie, die KLH-Behandlung mit Mitomycin als Rezidivprophylaxe verglich, zeigte sich ein signifikanter Vorteil der KLH-Behandlung. Im Vergleich mit der BCG-Prophylaxe zeigte sich hingegen kein bedeutsamer Unterschied dieser beiden Therapien<sup>108,120</sup>.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Prognose des urothelialen Harnblasenkarzinoms (G2 / G3) trotz der unterschiedlichen Therapieansätze insgesamt noch sehr eingeschränkt ist, was durch dessen Neigung zu Rezidiven und durch sein häufig multilokuläres Auftreten zu erklären ist<sup>7,90</sup>. Die Rezidivhäufigkeit wird mit 50-70% angegeben, wobei das Rezidiv häufig ein weiter fortgeschrittenes Infiltrationsstadium sowie einen höheren Malignitätsgrad im Vergleich zum Primärtumor aufweist<sup>16,191</sup>. Als ursächlich für diese Rezidivneigung gelten verschiedene Faktoren, deren Bedeutung im Einzelnen noch nicht geklärt ist. Hierzu zählen die fortgesetzte Exposition mit Karzinogenen und das infolge der langjährigen lokalen karzinogenen Belastung multiple Auftreten präneoplastischer Veränderungen. Auch eine intraepitheliale Implantation maligner Zellen im Rahmen einer TUR kann nicht vollständig ausgeschlossen werden<sup>208</sup>.

Die Prognose hängt wesentlich sowohl von der histologischen Differenzierung<sup>119</sup> als auch vom Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Diese Faktoren erweisen sich beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom in einer Studie von Rübben und Mitarbeitern (1988)<sup>195</sup> allen anderen erhobenen Parametern (Alter, Geschlecht, Tumorgröße- und -Lokalisation und Multilokularität) als überlegen.

Der Zeitpunkt der Diagnose im Rahmen der Zystoskopie ist bei schlecht einsehbaren Tumoren (im Blasen Hals oder an der Blasen vorderwand) relativ spät, so dass sich sekundär eine Korrelation zwischen Lokalisation und Prognose ergibt<sup>112</sup>. Hochdifferenzierte oberflächlich wachsende Karzinome sind mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 85% als prognostisch günstig einzustufen, wohingegen sich diese Überlebensrate bei gleicher Infiltrationstiefe, jedoch entdifferenzierten Tumoren auf nur 25% senkt<sup>15</sup>. Ebenso ändert sich die Metastasierungsneigung gut differenzierter Tumore mit deren Infiltrationsstadium.

Befindet sich der Tumor im Stadium PTa, so ist nur in 1% der Fälle mit einer Metastasierung zu rechnen. Jedoch schon 14-22% im Stadium pT1<sup>193,213</sup> zeigten, dass das oberflächliche Harnblasenkarzinom nach Einbruch in die Lamina propria seine bis dahin gute Prognose verliert. Bei allen invasiven Tumoren, ungeachtet ihrer Differenzierung, findet sich nach radikaler Zystektomie und/oder Radiatio eine 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 55-77%<sup>17</sup>. Wesentlich schlechter wird die Prognose bei Befall regionärer Lymphknoten, die selbst durch sorgfältige Lymphadenektomie kaum verbessert werden kann<sup>185</sup>.

Deshalb wird erörtert, Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen als Ausdruck einer systemischen Tumorerkrankung den belastenden Eingriff der Zystektomie zu ersparen und lediglich palliativ zu behandeln<sup>172,22</sup>.

### 1.3. Bekannte Risiken für das Blasenkarzinom

Seit den frühen Siebziger Jahren steht fest, dass das Blasenkarzinom in seiner Pathogenese eng mit der Einwirkung chemischer Karzinogene aus der Umwelt zusammenhängt und durch zivilisationsbedingtes Verhalten (z.B. Nikotin) provoziert wird<sup>42</sup>.

Diese Risiken unterteilen sich in folgende Hauptkategorien:

#### **Rauchkonsum (Tabak):**

Verschiedene Studien haben versucht, den Zigarettenkonsum als Risikofaktor oder Verursacher der Entwicklung eines Blasenkarzinoms darzustellen. So konnten Augustine (1988)<sup>6</sup>, Cavel (1989)<sup>40</sup> und D'Avanzo (1990)<sup>46</sup> das Erkrankungsrisiko für das Blasenkarzinom bei Zigarettenrauchern als zweieinhalb bis viermal so hoch wie das von Nichtrauchern einstufen. Es wird geschätzt, dass bei einem täglichen Konsum von ungefilterten Zigaretten über 2 Jahre ca. 3 mg Naphtylamin inhaliert werden<sup>238</sup>.

#### **Chemische Karzinogene der Industrie:**

Zum ersten Mal aber wurde 1985 durch Ludwig Rehn der ätiologische Zusammenhang zwischen langjähriger Belastung mit polyzyklischen aromatischen Aminen in der Farbstoffindustrie und dem Auftreten von Blasenkarzinomen nachgewiesen. Eine spätere ausführliche Studie von Case (1954)<sup>34</sup> belegt, dass das Arbeiten in der Farbstoffindustrie, was einen langjährigen Umgang mit Arylaminen bedeutet, das Risiko einer Krebserkrankung um das dreißigfache erhöht. Er errechnete eine Latenzperiode für die Entwicklung des Tumors von 18 Jahren.

Gerade die durch die industrielle Karzinogene bedingten Tumore sind besonders aggressiv<sup>175</sup>, was sich auch darin zeigt, dass Blasenkarzinome dieser Genese im allgemeinen früher, das heißt bereits im Alter von 45-55 Jahren diagnostiziert werden<sup>141</sup>.

#### **Medikamente:**

Einige Autoren, darunter Morrison (1984)<sup>161</sup> schuldigen gemäß ihrer Untersuchungen das Alkylans Cyclophosphamid an, ein Blasenkarzinom zu verursachen. Auch unter Patienten mit Phenacetin-Abusus sind mehr Blasenkarzinome als in der Kontrollgruppe aufgetreten<sup>66</sup>.

#### **Künstlicher Süßstoff:**

Nach anfänglichen alarmierenden Ergebnissen einer tierklinischen Untersuchung<sup>89,176</sup> zu der Frage einer Blasenkarzinomreduzierbarkeit durch Saccharin oder Cyclamat hat sich jedoch in neueren Studien eine solche Korrelation zwischen dem Auftreten von Blasentumoren und dem Konsum dieser Substanzen nicht bestätigen lassen<sup>44,159</sup>.

#### **Kaffeegenuss (coffein):**

1971 veröffentlichte Cole als erste eine Studie mit dem Thema des Zusammenhanges von Kaffeekonsum und der späteren Entwicklung eines Karzinoms des unteren Harntraktes. Sowohl diese als auch Folgestudien konnten keinen wirklichen Zusammenhang insofern nachweisen, dass Menschen, die regelmäßig Kaffee trinken, ein erhöhtes Risiko haben.

#### **Chronische Zystitiden:**

Die bisher häufigste und ätiologisch am besten untersuchte Ursache für das Entstehen eines Blasenkarzinoms ist der Zusammenhang mit dem Vorliegen einer chronischen Entzündung, vor allem bei Billharziose<sup>91</sup>, die in den Ländern mit hoher Inzidenz dieser Infektionskrankheit zu einer Häufung der sonst seltenen Plattenepithelkarzinome führt. Desgleichen kommt es auch bei klinisch relevanten Blasendivertikeln (Harnstau) zu einer signifikant höheren Inzidenzrate von Blasenkrankung<sup>100</sup>.

#### **Fremdstoffmetabolismus:**

Die ersten Untersuchungen von Cartwright (1982)<sup>33</sup> und später von Roots (1992)<sup>187</sup> zeigen, dass genetisch determinierte Varianten der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus eine große Bedeutung als Effekt-Modifikatoren haben, die die Wirkungen von Umweltgiften verstärken oder abschwächen können. Bestimmte Enzymkonstellationen können so zwar keinen Tumor initiieren, aber als Suszeptibilitätsfaktoren das Auftreten begünstigen.

Bei unserer klinischen Studie haben wir folgende Risikofaktoren untersucht:

- Rauchen
- Alkohol

Das Patientenkollektiv (118) ergab, dass insgesamt 111 Patienten geraucht oder/und Alkohol getrunken haben. Die weitere Datenauswertung zeigte, dass von 42 Rauchern bei 26 Patienten ein Tumorrezidiv auftrat. Von insgesamt 69 Patienten mit Alkoholkonsum wurde ebenso bei 37 Patienten Tumorrezidive festgestellt.

## 1.4 Tumor-Suppressor-Gene

Im Gegensatz zu den dominanten Onkogenen, die eine Proliferationsinformation enthalten und durch Mutationen aktiviert werden, stellen die Suppressor-Gen-Produkte die Negativregulatoren dar<sup>26</sup>. Das Wildtyp-Allel eines Tumor-Suppressor-Gens ist funktionell dominant gegenüber dem mutierten Allel in der Zelle; daher auch die Bezeichnung „rezessive Onkogene“. Durch Mutationen verlieren sie ihre Funktion und können so zur Kanzerogenese beitragen. Bewiesen wurde ihre Existenz durch die Hybridisierung von Normalzellen mit Tumorzellen. Die entstandenen Hybriden waren phänotypisch normal. Ihre biologische Funktion stand u.a. aber wesentlich in der Hemmung der Zellproliferation. Damit spielen sie eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und sind in der Lage, in bestimmten Situationen einen Wachstumsstop zu induzieren. Auch bei der Kontrolle des Zell-zu-Zell-Kontaktes sind Suppressorgene beteiligt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass auch eine Interaktion von ihnen mit Onkogenen stattfindet.

Bei verschiedenen Tumoren fand man, dass bestimmte Chromosomenabschnitte fehlten bzw. beschädigt waren. In weiteren Untersuchungen konnten dann die entsprechenden Suppressorgene isoliert werden. Die wichtigsten sind in der folgenden Tabelle dargestellt<sup>235</sup>:

**Tabelle 1: Tumor-Suppressor-Gene**

Gen	Tumor	Lokalisation
RB - Gen	Retinoblastom	13q14
WT - 1 - Gen	Wilms-Tumor	11p
P53 - Gen	verschiedene Tumore	17p13
APC - Gen	Polyposis coli	5q21
DCC - Gen	kolorektales Karzinom	18q
NF - 1 - Gen	Neurofibromatosis von Recklinghausen	17a11

Der Schluss Suppressorgendefekte – Karzinogenese ist jedoch nicht so einfach zu ziehen, die Vorgänge sind bei den meisten Tumoren wesentlich komplexer. So kann der fehlende Suppressorgen-Einfluss zur Erklärung ungehemmter Wachstums- und Heilungsprozesse herangezogen werden, für die Invasivität und Metastasierung ist er allein nicht ausreichend (Notwendigkeit membrangebundener Adhärenzmoleküle für die Metastasierung u.a.).

Einige Theorien gehen heute von einer „multiplen Hit-Theorie“ aus. Davon zeugt auch der in dieser Arbeit betrachtete genetische Defekt des P53-codierenden-Abschnitts auf dem Chromosom 17, der, wie schon erwähnt, einer der häufigsten bei menschlichen Malignomen überhaupt ist. Dabei handelt es sich entweder um den Verlust ganzer Allele oder um einzelne Punktmutationen<sup>131</sup>.

## 1.5 Fragestellung und Untersuchungsziele

Das Urothelkarzinom der Blase gilt als eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen im Bereich der ableitenden Harnwege und ist daher von zentralem Interesse in der urologischen Forschung. Insbesondere Diagnostik und Therapien dieses Leidens unterliegen einem stetigen Wandel.

Um eine Aussage bezüglich der Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit und damit in Richtung der Prognose der Erkrankung zu treffen, werden zur Zeit in erster Linie die histopathologischen Parameter von Tumor-stadium und -differenzierung näher betrachtet, an denen sich auch die Therapieentscheidung maßgeblich orientiert. Wie u.a. die Studie von Abel et al.<sup>1</sup> zeigt, lässt sich jedoch anhand dieser Kriterien allein keine ausreichende Genauigkeit erzielen. Einerseits scheint eine Therapieentscheidung, die sich einzig und allein auf die oben genannten Parameter stützt, scheint problematisch zu sein. Insbesondere mit Blick auf weitreichendere Konsequenzen, die z.B. eine radikale Zystektomie für die Lebensqualität des Patienten mit sich bringt. Andererseits ist die möglichst frühzeitige Selektion von Patienten, die ein erhöhtes Rezidiv- und Progressionsrisiko aufweisen, für eine adäquate Therapiewahl und damit letztendlich auch für die Prognose von großer Bedeutung. Bisherige Studien konnten hierzu dieses Problem nicht hinreichend klären<sup>14</sup>.

Gegenstand der heutigen Forschung ist somit u.a. die Suche nach einem geeigneten Kriterium (z.B. Tumormarker), das neben Tumorstadium und -differenzierung Informationen über Wachstumsverhalten und malignes Potenzial eines urothelialen Karzinoms geben kann.

Deshalb ist in dieser klinischen Untersuchung zu klären, inwieweit der Funktionsverlust des Tumor-Suppressor-Proteins p53 Einfluss auf die weitere Entwicklung des Tumors nimmt und damit zu einer geeigneten Therapieentscheidung beiträgt. Die Bevorzugung fiel gerade auf dieses Protein (p53), da das p53 codierende Gen auf dem Chromosom 17p13.1 bereits lokalisiert ist und Mutationen in diesem Abschnitt im Zusammenhang mit gefundenen menschlichen Malignomen zu den häufigsten genetischen Veränderungen führen<sup>133</sup>. Auch in Verbindung mit Harnblasenkarzinomen werden p53-Mutationen als häufig anzutreffendes Ereignis beschrieben<sup>237,68,203</sup>. Es scheint also nutzbringend, ihre Auswirkungen zum Gegenstand genauerer Untersuchungen zu machen.

Zusammenfassend sollen die Ziele dieser klinischen Arbeit formuliert werden:

- 1) Urothelkarzinome der Harnblase unterschiedlicher Infiltrationstiefe und Differenzierung sollen immunhistochemisch auf eine mögliche p53-Mutation und eine daraus resultierende nukleare Überexpression des codierten Tumor-Suppressor-Proteins hin untersucht werden.
- 2) In der Folge gilt es, die ermittelten Ergebnisse mit den histopathologischen Parametern Tumorstadium und -differenzierung zu korrelieren, um einen möglichen Einfluss des p53-Funktionsverlustes auf fortschreitende Infiltration und Entdifferenzierung des Tumors nachzuweisen.
- 3) Weiterhin soll diese Untersuchung ergründen, ob die prognostische Wertigkeit einer p53-Überexpression bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs beweisbar ist und inwieweit ein Zusammenhang zwischen Effektivität der BCG-Therapie und der p53-Überexpression besteht.

## 2. Grundlagen zur experimentelle Studie und Methoden

---

### 2.1. Patientendaten

In der vorliegenden retrospektiven Untersuchung wurden Tumorresektate von insgesamt 134 männlichen und weiblichen Patienten aufbereitet, welche zwischen den Jahren 1994 und 2002 in der urologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses Bogenhausen in München dokumentiert wurden.

Das Geschlechtsverhältnis lag bei: 101 männliche Patienten (75,37%) und 33 weibliche Patienten (24,63%). Bei Befunderhebung lag das Alter der Patienten zwischen 43 und 95 Jahren, bei einem Altersdurchschnitt von 69 Jahren. Der Altersmedian betrug 60 Jahre.

Es wurden nur Patienten ausgewählt, die ein oberflächliches Urothelkarzinom der Blase aufwiesen. Aus den Tumorpatienten wurden drei Hauptgruppen pTa, pT1 und pTis (insitu) gebildet. Die Einteilung erfolgte entsprechend der postoperativen histologischen Enddiagnosen.

**Tabelle 2: Postoperative histologische Enddiagnosen des Patienten**

	Man	Frau	Summe
PTA	90	28	118
PT1	8	5	13
Tis	3	0	3
<b>Gesamt:</b>	<b>101</b>	<b>33</b>	<b>134</b>

#### 2.1.1. Dateneigenschaften

Im Institut für Pathologie des städtischen Krankenhauses Bogenhausen in München (Chefarzt: Prof. Dr. med. Nehrlich) wurde für jeden Patient eine standardisierte pathoanatomische Befunddokumentation in Form eines „Tumorbefundes für Malignome der Blase“ durchgeführt. Diese Daten konnten in zwei Informationssegmente aufgeteilt werden.

1) Befundbogen und persönliche Daten der Patienten:

- Alter des Patienten
- Geschlecht des Patienten
- Tumorlokalisierung
- Tumorstadium
- Infiltrationstiefe
- pTNM – Klassifikation

2) Die histologischen Merkmale der Tumore:

- Tumor-Grading
- Nachweis des Tumormarkers p53
- Prozentualanteil der p53

Angaben zum Verlauf der Erkrankung wurden durch Nachuntersuchungen des Patientenkollektivs gewonnen. Diese Nachuntersuchungen erfolgten bis einschließlich des Jahres 2002. Somit ergeben sich entsprechend der Jahrgänge der Operationspräparate Überwachungszeiträume von einem bis acht Jahre.

Außerdem sind folgende Informationen je Patient im Verlauf der Behandlungen dokumentiert und festgehalten:

- Rezidivrate
- BCG/Mitomycin Therapie
- Risikofaktoren und Nebendiagnose
- Überlebenszeitraum des Patienten

## **2.2. Tumormaterial**

Anhand der pathologisch-anatomischen Befunde wurden nur vorbehandelte primäre Urothelkarzinome der Blase in die vorliegende Untersuchung aufgenommen. Vier Präparate wurden mangels auswertbarem Tumorgewebe aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Bei den verbleibenden Präparaten handelt es sich um Karzinome der Blase in verschiedenen Lokalisationen.

Die Operationspräparate wurden in der Pathologie aufgearbeitet. Repräsentative Gewebstücke wurden in 40% Formalin-Lösung fixiert und anschließend in Paraffin (Paraplast ®) eingebettet. Zur histologischen Bewertung und immunhistochemischen Färbung wurden von den Paraffinblöcken nach standardisierten histologischen Techniken 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Bewertung der Präparate wurden je ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin und ein weiterer immunhistochemisch gefärbt.

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. Farbliche Nachweismethode**

Zum immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins an Paraffinschnitten wurde die Indirekte Immunperoxidase Methode angewandt und wie folgt ausgeführt :

#### **Ausführung:**

Die in Paraffin eingebetteten Tumorproben werden mittels Mikrotom in 2-4 Mikrometer dicke Schnitte geschnitten und anschließend auf mit Vectabond ( R ) vorbehandelte Objektträger aufgezogen. Anschließend werden sie bei bis 37°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Durch ein 10-minütiges Xylolbad werden die Proben deparaffiniert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, Ethanol, jeweils 10 Minuten) rehydriert. Die endogene Peroxidase wird durch ein 30-minütiges Bad in 1% H<sub>2</sub>O/Methanol gehemmt. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Puffer werden die Schnitte im 10 mm Citratpuffer-Bad bei 600 Watt vier Mal 5 Minuten per Mikrowelle erhitzt.

Durch Nachfüllen von PBS-Puffer wird ein Trockenfallen der Schnitte verhindert. Anschließend werden die Präparate im Citratpuffer 20 Minuten abgekühlt. Danach wird ein dreimaliges Waschen im PBS-Puffer erforderlich. Die zu untersuchenden Schnitte werden dann mit dem Primärantikörper (p53/Fa. DAKO,Hamburg), die zugehörigen Negativ-Kontrollen mit einem unspezifischen IgG1 Mäuse-Antikörper in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten. Es folgt ein dreimaliges Waschen der Präparate im PBS-Puffer. Als nächster Schritt werden alle Schnitte für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Auch hierbei ist ein dreimaliges Waschen im PBS-Puffer unerlässlich.

Schließlich werden alle Schnitte mit dem Sekundärantikörper 45 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Im letzten Schritt werden die Präparate mit einem speziellen Fixiermittel (Histomount ( R ) eingedeckelt und bei bis zu 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop von zwei unabhängigen Untersuchern ( Institut für Pathologie am Krankenhaus Bogenhausen München ) auf braungefärbte Zellkerne hin untersucht.

### **2.3.2. Auswertung der p53-Färbung**

Als immunhistochemisch positiv wurde ein Zellkern betrachtet, wenn er eine rotbraune Färbung aufwies. In jedem Tumorpräparat wurden 2000 Tumorzellen ausgewertet. Von den Gesamtumorzellen wurden die Zellen mit positiv gefärbten Kernen gezählt. Aus diesen Werten ließ sich der Prozentsatz an gefärbten Tumorzellkernen errechnen. Bestanden in einem Tumor unterschiedliche Färbemuster, wurden die Bereiche mit der höchsten Dichte an gefärbten Zellkernen ausgezählt.

Zur statistischen Auswertung werden die Tumore entsprechend ihrer prozentualen p53-Anfärbung in quantitativen Gruppen zusammengefasst.

Folgende Gruppen repräsentieren vier grundlegende Anfärbemuster zu den untersuchten Tumoren:

#### **Gruppe 1): keine bzw. vereinzelt gefärbte Zellenkerne. (P53=0=Negativ)**

Das erste Anfärbemuster zeichnet sich durch keine oder nur vereinzelt gefärbte Zellenkerne im Tumorbereich aus. Dabei kann die Anzahl der positiven Zellenkerne sehr gering sein, zum Beispiel nur 1 Prozent der Tumorzellkerne. Auch in anderen Studien stellte sich die Frage, ob man eine solch geringe Anfärbung als positive oder als negative Reaktion betrachten kann<sup>126</sup>. Da diese Untersuchung durch Verwendung der immunhistochemischen Färbemethode über eine sehr hohe Sensitivität verfügt und nicht ausgeschlossen ist, dass sich auch nicht mutiertes p53 anfärbt<sup>224</sup>, werden zur Verringerung von falsch-positiven Fehlern nur Tumore mit einer Anfärbung von mehr als 1 Prozent der Tumorzellkerne als p53-positiv betrachtet und analysiert. Befinden sich weniger gefärbte Tumorzellkerne in den Präparaten, so wird der Tumor als p53-negativ eingestuft und der Gruppe 1 zugeordnet.

#### **Gruppe 2): Verstreute Farbmuster (P53<20%)**

Das zweite Färbemuster zeigt verstreut liegende p53-positive Zellenkerne. Die stark gefärbten Kerne sind über das Tumorgebiet verteilt und machen <20% der Gesamtumorzellzahl aus.

#### **Gruppe 3): Deutliche Verfärbung der Zellen (P53>=20%<=40%)**

Eine aufgrund der Zellenfärbung deutliche, mikroskopisch sichtbare Abgrenzung zwischen normalem Gewebe und dem Tumor kennzeichnet die Präparate mit einer Kernanfärbung von 20 bis 40%.

#### **Gruppe 4): Vollständige Verfärbung der Zellen (P53>40%)**

Tumorpräparate der Gruppe 4 zeichnen sich durch eine fast vollständige Färbung aller Tumorzellkerne aus (> 40%). Bei diesen Tumoren sind nur einzelne nicht gefärbte Zellkerne im Tumorbereich zu erkennen.

### **2.3.3. Statistikmethoden und Berechnungen**

Die Ergebnisse werden zunächst deskriptiv ausgewertet und in Form von Tabellen und Diagrammen dargestellt. Um die Ergebnisse auf Bedeutsamkeit zu überprüfen, werden folgende statistische Analysen von der Biometrischen Abteilung der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt.

Als Signifikanzniveau wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  festgelegt.

Zur Berechnung der statistischen Werte wurden folgende Methoden angewendet:

**Chi-Quadrat-Test :** Dieser Test wurde angewendet bei größeren Fallzahlen, bei denen die Erwartungswerte größer/gleich 10 sind.

**Exakt-Fischer-Test:** Diese Test wurde angewendet, wenn die Erwartungswerte kleiner als 10 sind.

**Binominaltest:** Bei Zufallsvariablen wurde dieser Test verwendet.

### **2.3.4. Auswertungen und Aussagen**

Die Auswertung orientiert sich an der Quantität der gefärbten Zellenkerne im Tumorbereich.

- Bei der Untersuchung auf p53-Überexpression unterscheiden wir 4 Gruppen:
- Zahlreich Positiv (+): >40% der Tumorzellkerne gefärbt
- Deutlich Positiv(+): 20%>=40% der Tumorzellkerne gefärbt
- Einfach Positiv (+): <20% der Tumorzellkerne gefärbt
- Negativ (-): 0% der Tumorzellkerne gefärbt

Die Aussagen sind nach den statistischen Bewertungen als repräsentativ bestätig.

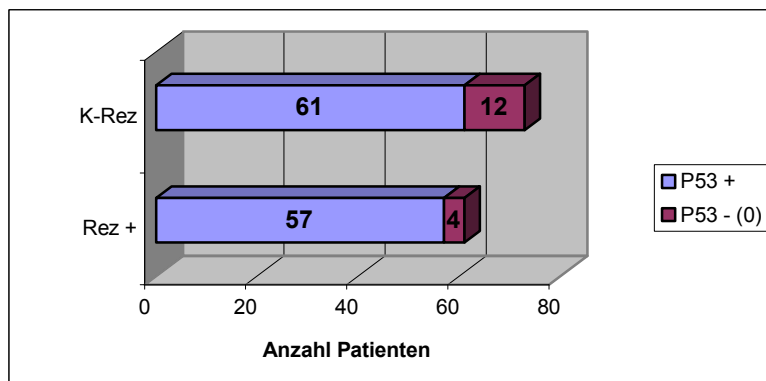
### 3. Ergebnisse aus den ausgewerteten Stammdaten

Für die Ausarbeitung dieser Studie und Untersuchung sind folgende Fragestellungen zu analysieren:

- Häufigkeit der p53-Expansion im gesamten Patientenkollektiv
- Korrelation zwischen Tumor-Marker und Rezidivhäufigkeit
- Abhängigkeit der Therapie von Rezidivhäufigkeit bei P53+
- Abhängigkeit der Therapie von Rezidivhäufigkeit bei P53-
- Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumorstadien bei p53+
- Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und prozentualen Anteil des P53
- Abhängigkeiten zu Risikofaktoren (Rauchen und Alkohol)

#### 3.1. Häufigkeit der p53-Expression im gesamten Patientenkollektiv

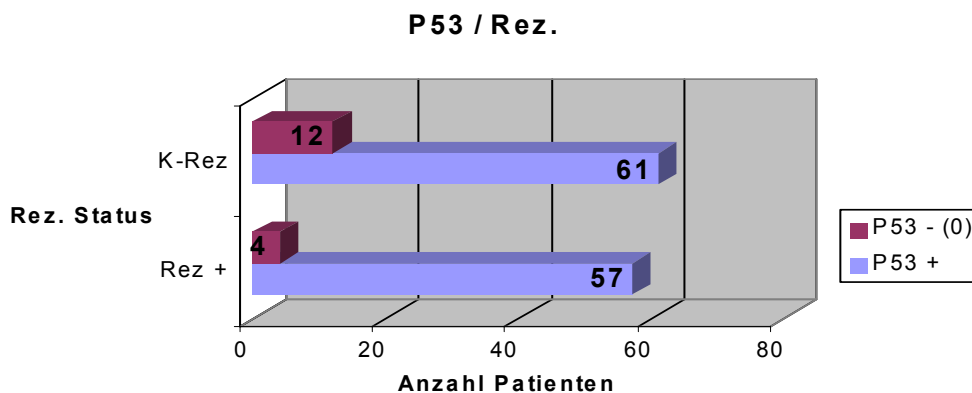
Mit Hilfe des Binomialtests ist die Auftrittshäufigkeit des Tumor-Markers P53 beim oberflächlichen Blasenkarzinom (im Gesamt-Patienten Kollektiv) signifikant festgestellt. K=16



Grafik 1:

#### 3.2. Die Korrelation zwischen Tumor-Marker und Rezidivhäufigkeit

Bei der Anwendung des Exakte-Fischer-Tests wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumor-Marker P53 festgestellt (Exakte P-Wert=0,1088).



Grafik 2:



### 3.3. Abhängigkeit von Therapie und Rezidivhäufigkeit bei P53+ (p53-Positiv)

In der Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die Anzahl der Patienten mit p53-positiv (p53+) in allen vorhandenen Tumorstadien, bei denen eine BCG/Mitomycin-Therapie durchgeführt wurde, aufgeführt.

**Tabelle 3:**

	Anzahl Rez.	BCG	Mito.
pTAG 1	35	8	2
pTAG 2	9	5	1
pTAG 3	5	2	0
pTAG, pTis	1	1	0
pT1 G2	2	1	1
pT1G3	2	2	0
pT1G3,pTis	2	1	0
pT1G4	1	0	0
<b>Gesamt:</b>	<b>57</b>	<b>20</b>	<b>4</b>

Weiterhin ist erkennbar, dass bei 57 Patienten (p53-Positivität) Tumorrezidive vorgekommen sind. Dabei wurde bei 24 Patienten eine Therapie durchgeführt, davon 20 Patienten mit „BCG-Therapie“ und 4 Patienten mit „Mitomycin-Therapie“.

**Tabelle 4:**

	Anzahl kein Rez.	BCG	Mito.
pTAG 1	27	3	4
pTAG 2	24	13	3
pTAG 3	2	0	1
pTAG, pTis	0	0	0
pT1 G2	1	1	0
pT1G3	7	3	0
pT1G3,pTis	0	0	0
pT1G4	0	0	0
<b>Gesamt:</b>	<b>61</b>	<b>20</b>	<b>8</b>

Bei 61 Patienten mit p53-Positivität ist eine Rezidivfreiheit erkennbar, dabei hatten hier 28 Patienten eine Therapie. Davon hatten 20 Patienten eine „BCG-Therapie“ und 8 Patienten eine Mitomycin-Therapie.

Auch hier lässt sich auf den ersten Blick erkennen, dass beim Großteil der p-53 positiven Patienten das Tumorstadium PTAG1 und PTAG2 erkannt wurde. Von den Patienten mit dem Tumorstadium PTAG1 (p53-positiv) hatten 35 Patienten ein Tumorrezidiv, von denen nur 10 Patienten behandelt wurden. 27 Patienten mit dem Tumorstadium PTAG1 (p53-positiv) waren rezidivfrei, davon wurden nur 7 Patienten behandelt.

Neun Patienten (p53-Positiv) mit Tumorstadium PTAG2 hatten Tumorrezidive, davon haben sich 5 Patienten einer „BCG-Therapie“ und 1 Patient einer „Mitomycin-Therapie“ unterzogen .

24 Patienten ( mit p53-positiv, PTAG2) waren rezidivfrei, bei 16 Patienten (13 mit „BCG-Therapie“ und 3 mit „Mitomycin-Therapie“) wurden entsprechende Therapien durchgeführt.

Zusammenfassend: stellt man die Gesamtreihe der p53-positiv (p53+) mit Rezidiven der Gesamtreihe der p53-positiv (p53+) Patienten mit Rezidivfreiheit gegenüber, so ergibt sich, dass 57 Patienten ein Rezidiv nachweisen, aber nur 24 Patienten eine Therapie vollzogen haben. Bei 33 Patienten wurde keine Therapie durchgeführt.

Von 61 rezidivfreien Patienten haben 28 Patienten eine Therapie durchgeführt und 33 Patienten hatten keine Therapie.

Bei der Anwendung des Chi-Quadrat-Tests konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Therapie und Rezidivrate bei P53 positiven Patienten nachgewiesen werden.  $P=0,6781$  (P-Wert soll  $< 0,05$ )

### 3.4. Abhängigkeit von Therapie und Rezidivhäufigkeit bei P53- (p53-Negativ)

Ebenfalls scheint interessant ein Blick auf die Patienten mit p53-negativ (p53 nicht nachweisbar=0) und deren Rezidivhäufigkeit, die in der Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 verdeutlicht ist. Von p53-negativen Patienten sind 4 Patienten mit Tumorrezidiv, von denen nur ein Patient eine BCG-Therapie hatte, und 12 Patienten, die rezidivfrei waren und nur zwei davon hatten eine BCG-Therapie.

**Tabelle 5: Eingeteilt in 1 und 2**

**Tabelle 1:**

Einzelne Aufteilung (P53(0)/Rez) mit BCG Therapie

	Rez.-Anzahl	BCG	Mito.
PTAG 1	3	1	0
PTAG 2	1	0	0
PTAG 3	0	0	0
<b>Gesamt</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

**Tabelle 2:**

Einzelne Aufteilung (P53-(0)/K-Rez) mit BCG Therapie

	Anzahl K-rez	BCG	Mito.
PTAG 1	10	2	0
PTAG 2	1	0	0
PTAG 3	1	0	0
<b>Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

Aufgrund kleiner Erwartungswerte wurde der Exakte-Fischer-Test durchgeführt. Eine signifikante Abhängigkeit zwischen Therapie und Rezidivrate bei P53-Negativität ist nicht nachweisbar.

### 3.5. Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumorstadien bei P53

Zur Beantwortung dieser Frage, wurde aus den vorhandenen Patientendaten folgende tabellarische Darstellung zusammengestellt.

**Tabelle 6:**

P53	gb	ge	gs	kr	te	Summe
0	4	0	0	12	0	16
2 bis 20	20	5	3	37	0	65
25 bis 40	6	2	0	12	1	21
50 bis 90	7	2	2	14	3	28
<b>Gesamt:</b>	<b>37</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>75</b>	<b>4</b>	<b>130</b>

Die Abkürzungen in der Grafik stehen für:

gb= Tumorstadium gleichbleibend

ge= Grading-erhöht

gs= Grading-gesenkt

te= Tumorstadium-erhöht

kr= kein rezidiv

Auf dem ersten Blick in der Gesamtreihe P53=0 lässt sich erkennen, dass bei 16 Patienten mit P53 negativ, 12 Patienten „kein Rezidiv nachweisbar“ und bei 4 Patienten mit Tumorrezidiv die Tumorstadien gleichgeblieben sind. Somit ist bei P53=0 der höchste Anteil an Rezidivfreiheit anzunehmen und eine bessere Prognose zu erwarten.

In dieser Tabelle wird ebenso das Verhältnis p53-Überexpression und Tumorstadium und Tumorrezidiv verdeutlicht. Der Vergleich beider Spalten „gb“ (Tumorstadium gleich bleibend) und „te“ (Tumorstadium erhöht) mit p53-Überexpression in Prozent lässt vermuten, dass je höher der prozentuale Anteil der p53 ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für die Erhöhung der Tumor-Stadien.

Aus der Tabelle 6 lässt sich erkennen, dass mit zunehmendem Anteil an p53-Überexpression und damit p53-Mutation (hier ab p53 30%) häufiger die Infiltrationstiefe des Urothelkarzinoms zunimmt.

Betrachtet man die Rezidivhäufigkeit des Harnblasenkarzinoms in Abhängigkeit ihrer P53-Expression ohne Unterscheidung nach Tumor-Stage und Tumor-Grad, so erhält man durch Vergleich der Spalte „kr“ (kein-Rezidiv) und p53 folgende Beweisführung:

Nachdem die berechneten Erwartungswerte alle größer als 10 sind, wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Mit dem Ergebnis  $p=0,0173$  und somit  $<0,05$  ist zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumorstaging und Tumorgrading ein signifikanter Zusammenhang festzustellen. Somit kann die charakteristische Aussage, je höher das Tumorstaging und –grading, desto höher die Rezidivrate, bestätigt werden.

**Tabelle 7:**  
**Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumorstadien**

	Anzahl Rez.	Anzahl Keine Rez
PTAG 1	35	27
PTAG 2	9	24
PTAG 3	5	2
PTAG 3, Cis	1	0
PT1G2	2	1
PT1G3	2	7
PT1G3, CiS	2	0
PT1G4	1	0
<b>Gesamt</b>	<b>57</b>	<b>61</b>

### 3.6. Abhängigkeit zwischen Rezidivhäufigkeit und prozentualen Anteil der P53

Für die Auswertung sind die Patienten hinsichtlich ihres prozentualen Anteils an P53 in vier Gruppen unterteilt:

- P53 = 0%
- P53 <20%
- P53 20% <=40%
- P53 >40%

Nachdem alle Erwartungswerte P größer als 10 sind, kann der Chi-Quadrat-Test durchgeführt werden.

Diese Auswertung zeigt, dass nicht die Aussage getroffen werden kann, dass mit zunehmendem Anteil der P53-Expression die Rezidivrate kontinuierlich zunimmt.  $P=0,1782$

**Tabelle 8:**

P53	RZ-0	RZ-1	RZ-2	RZ-3	RZ-4	Summe
0	12	3	1			16
2 bis 20	3	2	1		1	7
25 bis 40				1		1
50 bis 90	9	1	1			11
<b>Gesamt:</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>35</b>

### 3.7. Abhängigkeiten zu Risikofaktoren (Rauch- und Alkoholkonsum)

Die Verteilung der Rezidivhäufigkeit des Tumors ist bei den Tumorpatienten mit Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum in Tabelle 3 dargestellt. Betrachtet wurden alle Patienten die derzeit Rauchen bzw. Alkohol konsumieren, die bereits geraucht oder Alkohol konsumiert haben sowie Patienten die beide Risikofaktoren konsumiert haben bzw. weiterhin konsumieren.

Anhand des Binominaltests konnte keine Abhängigkeit zwischen Rauchen/Alkohol als Risikofaktoren und Rezidivwahrscheinlichkeit festgestellt werden.  $K=16$  , $K=32$

**Tabelle 9:**

#### **Rauchen (inkl. Alkoholgenuß)**

	Man	Frau	Summe
kein rezediv	20	6	26
rezediv	13	3	16
<b>Gesamt:</b>	<b>33</b>	<b>9</b>	<b>42</b>

**Tabelle 10:**

#### **Alkoholgenuß (inkl. Rauchgenuß)**

	Man	Frau	Summe
kein rezediv	33	4	37
rezediv	28	4	32
<b>Gesamt:</b>	<b>61</b>	<b>8</b>	<b>69</b>

## 4. Diskussion

---

### Fragestellung und Untersuchungsziele

Das Urothelkarzinom der Blase gilt als eine der häufigsten malignen Erkrankungen der ableitenden Harnwege und ist daher von zentralem Interesse in der urologischen Forschung. Insbesondere Diagnostik und Therapien dieses Leidens unterliegen einem stetigen Wandel.

Zusammenfassend sollten diese Ziele unserer klinischen Arbeit beantwortet werden:

- 1) Urothelkarzinome der Harnblase unterschiedlicher Infiltrationstiefe und Differenzierung sollten immunhistochemisch auf eine mögliche p53-Mutation und eine daraus resultierende nukleare Überexpression des codierten Tumor-Suppressor-Proteins hin untersucht werden.
- 2) In der Folge galt es, die ermittelten Ergebnisse mit den histopathologischen Parametern Tumorstadium und -differenzierung zu untersuchen, um einen möglichen Einfluss des p53-Funktionsverlustes auf fortschreitende Infiltration und Entdifferenzierung des Tumors nachzuweisen.
- 3) Weiterhin sollte diese Untersuchung ergründen, ob die prognostische Wertigkeit einer p53-Überexpression bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs beweisbar ist und inwieweit ein Zusammenhang zwischen Effektivität der BCG-Therapie und der Rezidivrate besteht.

### Onkogene und Tumorsuppressorgen p53

Unter Regulations-, Wachstums- oder Differenzierungsgenen sind auch Onkogene<sup>4,18,26,40,66,193,209</sup> oder Tumor-Suppressor-Gene<sup>82,83,129,226</sup> einzureihen.

Onkogene wurden ursprünglich in transformierenden Retroviren entdeckt<sup>189</sup>, später aber als normale, nicht-tumorigene Komponenten des Genoms („Protoonkogene“) in zahlreichen höheren Organismen wiedergefunden<sup>21</sup>, wo sie offensichtlich zum normalen Gen-Bestand gehören und unter fein regulierter Expressionskontrolle über spezielle Signalbahnen in Differenzierungs- und Wachstumsprozesse involviert sind<sup>61,223</sup>. Unterschieden werden die Onkogene anhand der Funktion und Komplementierung der durch sie exprimierten Proteine<sup>11,12,21,61</sup>.

Zur Transformation der Zelle kommt es, wenn diese Gene eine Aktivierung erfahren, der ihren Expressionsstatus in qualitativer oder quantitativer Hinsicht verändert. Dies erfolgt z.B. durch Punktmutationen<sup>36,215</sup>, Gen-Amplifikationen<sup>198</sup> oder eine veränderte Promotorkontrolle<sup>115</sup>. Unter diesem Aspekt sind beispielweise die durch PAK (Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff) ausgelösten somatischen Mutationen zu sehen. So wurden in zahlreichen Untersuchungen entsprechende DNA-Modifikationen, wie sie bei Exposition gegenüber PAK entstehen, als kausale Vorstufe aktivierter Onkogene nachgewiesen<sup>5,19,32,52,144,231</sup>. Dabei wird in den Zielorganen dieser chemischen Kanzerogene (v.a. Haut und Lunge) die Korrelation zwischen Exposition gegenüber Vertretern dieser Substanzklasse und Onkogen-Aktivierung in vivo durch entsprechende Befunde in experimentell erzeugten Versuchstiertumoren<sup>45</sup> bzw. Tumorgewebsproben von Rauchern<sup>139,183</sup> gestützt.

Verglichen mit den Onkogenen scheint das Tumor-Suppressor-Gen p53 eine offenbar noch entscheidendere Bedeutung für die Entstehung von Tumoren zu haben (s. Abb.1-1). Es ist das mit Abstand am häufigsten in menschlichen Tumoren in mutierter Form nachgewiesene Gen<sup>37,75,84,93,133,230</sup>. So wird es mit hoher Frequenz v.a. in kolorektalen und Lungentumoren, aber auch in vielen anderen Arten von Neoplasien gefunden<sup>8,70,75,118,164,216</sup>.

Der Nachweis von p53-Mutationen gilt - nahezu unabhängig von der Art des Tumorgleichsams - als ungünstiger prognostischer Marker bezüglich der Aggressivität des Tumors und der Überlebenschance des Patienten<sup>53,79,106,117,146,155,182,188,204,214,222,226</sup>.

In nicht mutierter Form ist das Genprodukt, das Tumorsuppressorprotein p53, in der Lage, sich als nukleäres Phosphoprotein in sequenz-spezifischer Manier an die DNA zu binden<sup>12,49,56,97,219</sup> und als transkriptionskontrollierender Faktor<sup>10,56,63,69,72,81,156,166,202</sup> die Zellproliferation transformierter Zellen zu blockieren<sup>9,65</sup> bzw. deren tumorigenen Phänotyp wieder umzukehren<sup>38</sup>. Aufgrund seiner Eigenschaft, nach einem DNA-Schaden den Zellzyklus zu arretieren<sup>38</sup> und dadurch die Reparatur der Nukleinsäure zu ermöglichen<sup>67,84,145</sup> oder aber die Zelle in den kontrollierten Sterbeprozess der Apoptose zu schicken<sup>57,60,199</sup>, wurde dieses Protein auch als „Wächter des Genoms“ (guardian of the genome) bezeichnet<sup>127</sup>.

Die Entdeckung des Tumor-Suppressor-Gens p53 erfolgte in Zusammenhang mit Studien über das transformierende SV40-Virus (Simian Virus 40) und dessen larger T-antigen, „So wurde das p53 zunächst als 54 kDa schweres Phosphoprotein identifiziert“ das mit diesem SV40-Antigen einen Komplex in der infizierten Zelle bilden kann<sup>125,158</sup>. Gleichzeitig wurde es aber auch in spontan transformierten bzw. chemisch-induzierten Tumorzellen gefunden<sup>48,138</sup>.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass das p53-Protein auch die Onkoproteine E18 bzw. E6 aus transformierenden Adenoviren<sup>197,241</sup> bzw. humanen Papillomviren<sup>232</sup> zu komplexieren in der Lage ist. Zur Zeit der erfolgreichen Klonierung des p53-Gens, beginnend im Jahre 1983<sup>80,168,244</sup>, hielt man es für ein Onkogen und das korrespondierende Produkt für ein Onkoprotein.

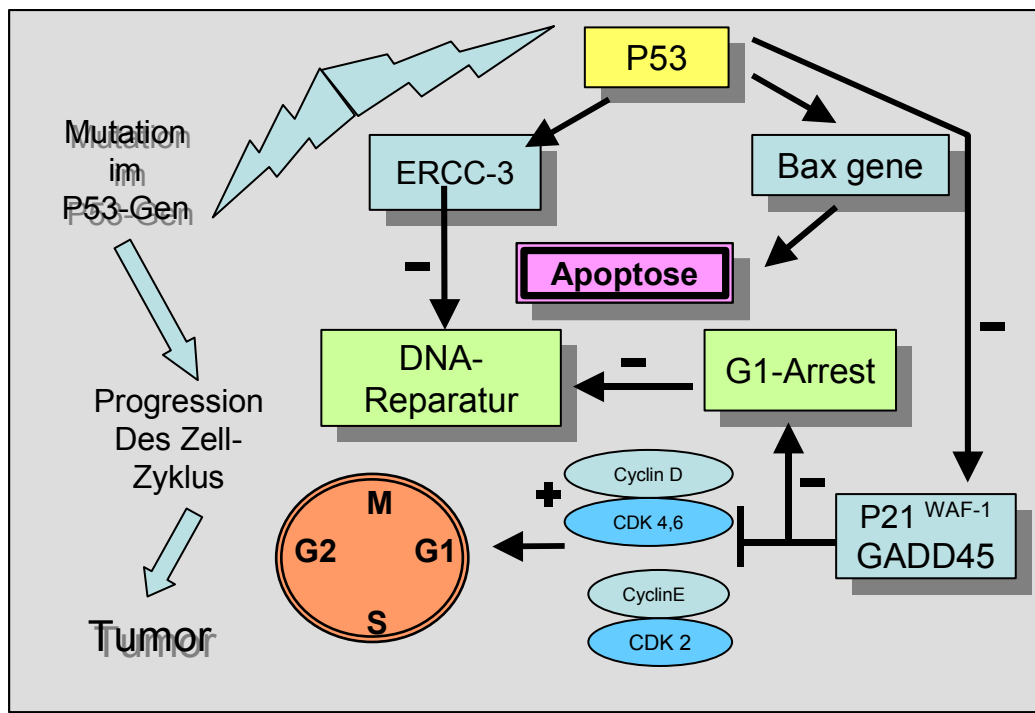


Abbildung 1

Dies basierte auf den Beobachtungen, dass die Transkription des Gens zu einer Immortalisierung von Zellen begrenzter Lebensdauer führte<sup>105</sup> bzw. in Kooperation mit dem Onkogen ras eine Transformation verschiedener Zelllinien induziert werden konnte<sup>58, 174</sup>.

Ab Ende der 80er Jahre wurde schließlich erkannt, dass es sich eigentlich um ein tumorsupprimierendes Gen handelt, das in mutierter Form zwar schwach onkogen wirken kann<sup>63</sup>, in Wildtypform jedoch die Transformation und Proliferation von Tumorzellen verhindert<sup>9,51,59,65,92,153</sup>.

Das Tumor-Suppressor-Gen p53 ist bei Mäusen auf Chromosom 11<sup>35,187</sup> und bei Menschen auf

dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) lokalisiert<sup>137</sup>. Die Gene beiderlei Spezies bestehen aus 11 Exons (der DNA-Bereich, der in Messenger-RNA transkribiert wird), von denen jeweils das erste nicht-codierend ist. Via Transkription werden 2,2<sup>171</sup> bzw. 2,5 kb<sup>80</sup> lange mRNA's gebildet, die jeweils für ein Protein codieren, das aus 387 (Maus) bzw. 393 Aminosäuren (Mensch) besteht<sup>131,209</sup> und posttranslational an Serinresten phosphoryliert<sup>18,148,153,217</sup> bzw. glykosyliert wird<sup>200</sup>. Die N-terminale aus 75-80 Aminosäuren bestehende Region ist stark ionisch und sauer; sie ist in der Lage eine  $\mu$ -helikale Struktur zu formen, die der (trans-)aktivierenden Domäne anderer Transkriptionsfaktoren sehr ähnlich ist<sup>64,178</sup>. Die zentrale core-Domäne zwischen den Aminosäuren 126 und 306 (hervorgehend aus den Exon 5-8) ist dagegen hydrophob und Prolin-reich, was für die DNA-Bindung entscheidend ist.

Die 1994 erfolgte Kokristallisation dieser Region mit einer gebundenen consensus-Sequenz der DNA<sup>39</sup> führte zu der Erkenntnis, dass die normalerweise in menschlichen Tumoren gefundenen Mutationen des p53-Gens gerade an Stelle dieser core-Sequenz des korrespondierenden Proteins auftreten, die als Kontaktpunkte zur Nukleinsäure dienen (> 85%)<sup>75</sup> (Greenblatt et al., 1994). Übereinstimmend damit sind es dann auch Mutationen an den Codons 157, 248 und 273, die in hoher Frequenz in menschlichen Tumoren gefunden werden<sup>75,93,94,134</sup>. Insbesondere ist eine Mutation an der Position 135 des Proteins dafür verantwortlich, dass das Protein in Kooperation mit den Onkogen ras die Transformation verschiedener Zelllinien induziert<sup>92</sup>. Die C-terminale Region des p53-Proteins schließlich (Reste 276-390 in Maus bzw. 319-393 in Mensch) ist basisch und eine erneute hoch geladene,  $\mu$ -helikale Strukturen formende Domäne. Sie ist notwendig zur Oligomerisierung des Proteins, da das p53 am effektivsten in Form von Tetrameren an die DNA bindet<sup>154,189</sup>. Weiterhin wird vermutet, dass sie den entscheidenden „Sensor“ für DNA-Schäden darstellt, basierend auf der nachgewiesenen Fähigkeit zur Erkennung von Mismatch-Mutationen<sup>114</sup> oder einzelsträngiger DNA<sup>104</sup>.

Aktiv wachsende und sich teilende Zellen in Kultur oder Geweben besitzen eine 3- bis 5-fach höhere Menge an p53-spezifischer mRNA als ruhende Zellen<sup>181</sup>. Insgesamt ist der Gehalt an p53-Protein in normalen bzw. nicht-transformierten Zellen jedoch relativ gering, auch bedingt durch einen hohen proteolytischen Umsatz. So liegt die Halbwertszeit des zell- und gewebesabhängigen Proteins im Rahmen von nur wenigen Minuten<sup>65,76,169</sup>. Andererseits können Mutationen - auch solche wie sie in transformierten Zellen vorkommen - über Konformationsänderungen des Proteins zu einer erheblich verlängerten Halbwertszeit und damit indirekt zu einem erhöhten Gehalt an p53 in der entsprechenden Zelle führen<sup>65,170</sup>.

Ein anderer Mechanismus liegt der Konzentrationserhöhung des p53-Proteins zugrunde, die nach Induktion eines DNA-Schadens durch UV-Strahlung<sup>78,143,243</sup>, ionisierende Strahlung<sup>109</sup> oder andere DNA-modifizierende Agentien wie Antitumormittel/Zytostatika<sup>109,163</sup> sowie PAH<sup>23,111,177,236</sup> gemessen werden. Dabei wird durch Einsatz von Transkriptions- bzw. Translationshemmern ein posttranslationeller Mechanismus der Stabilisierung des nicht-mutierten p53-Proteins nachgewiesen, von dem angenommen wird, dass er auf Phosphorylierung, poly-ADP-Ribosylierung, Proteinbindung oder Oligomerisierung beruht<sup>109,112,143,227</sup>.

Eine Überexpression des nicht mutierten p53-Proteins (Wildtyp) induziert in Tumorzellkulturen einen Wachstumsstopp<sup>9,35,65,151</sup> oder die Apoptose<sup>140,162,199,242</sup> der betroffenen Zellen. Es konnte dargelegt werden, dass der Zellzyklus, ausgelöst durch einen DNA-Schaden und vermittelt durch eine erhöhte Konzentration an Wildtyp-p53 in der Zelle, sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase arretiert<sup>4,77,109,212</sup>. Da der Wachstumsstopp in p53-defizienten Zellen immer noch in G2, nicht mehr jedoch in G1 erfolgen kann, ist die Schlussfolgerung erlaubt, dass das Tumorsuppressorprotein p53 in seiner nicht-mutierten Form für die Arretierung des Zellzyklus in G1 essentiell notwendig ist<sup>109</sup>.

Klar ist bislang, dass die Expression von Regulationsfaktoren aktiviert wird, die ihrerseits wiederum negativ auf das Zellwachstum bzw. auf die Expression von Zellwachstumsfaktoren einwirken<sup>229</sup>. Sicher jedoch ist, dass das Produkt eines weiteren p53-Zielgens, das sogenannte „Wild-typ p53 Activated Fragment 1“ (WAF1), die tumorsupprimierenden Eigenschaften des p53 in Zellkultur vermittelt<sup>56</sup>.

Das Gen selbst enthält die p53-Bindedomäne in seiner proximalen Promoterregion. Da sein Proteinprodukt noch in weiteren Untersuchungen entdeckt wurde und als „CDK-interactin protein 1“<sup>81</sup> bzw. p21<sup>239</sup> bezeichnet wurde, trägt es heute üblicherweise den Namen p21WAF1/Cip1 (s. Abb. 1-1). Das p21WAF1/Cip1-Protein ist in der Lage Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent Kinases), CDK's zu inhibieren, deren Aktivität für die Zellzyklus-Progression, also das Durchlaufen und den geregelten Übergang der einzelnen Zellzyklusphasen, insbesondere von G1 nach S, zwingend erforderlich ist<sup>81,85,114,239</sup>. Wird nun durch einen DNA-Schaden die p53-Akkumulation in der betroffenen Zelle induziert (s.o.), so wird der dadurch initiierte Zellzyklusstopp mit großer Wahrscheinlichkeit durch p21 WAF21/Cip1 vermittelt<sup>50,56,57</sup>.

Dabei scheint die Arretierung des Zellzyklus eine Art passiver zellulärer Abwehrmechanismus zu sein, der die Replikation modifizierter DNA verhindert und damit der enzymatischen Reparatur des Schadens den Weg bahnt<sup>136,147,205,239</sup>. Übereinstimmend mit diesen Annahmen wurde festgestellt, dass p21WAF1/Cip1 wohl die „Proliferation Cell Nuclear Antigen“ (PCNA-)abhängige DNA-Replikation, nicht jedoch eine DNA-Reparatur in vitro inhibiert<sup>137</sup>. Auf der anderen Seite konnte jedoch in weiteren Untersuchungen auch demonstriert werden, dass neben der p53-abhängigen eine p53-unabhängige Regulation des p21WAF1/Cip1<sup>201</sup> und gleichfalls auch eine p53-unabhängige tumorsupprimierende Funktion dieses Proteins existieren muss<sup>240</sup>.

### **P53 – Immunhistochemie**

Es bestehen widersprüchliche Aussagen darüber, welche Rolle P53 bei urologischen Tumoren spielt und wie oft es in nachweisbarer Form überhaupt bei den einzelnen Tumorarten auftritt. Es soll deshalb die Darstellung von p53-Antigen (dem eigentlichen Protein) in histologisch aufgearbeiteten Tumorgewebsproben von oberflächlichen malignen Tumoren auf urologischem Gebiet erfolgen. Dazu werden immunhistochemische Färbungen an Nachschnitten des archivierten Tumormaterials durchgeführt. Das akkumulierte p53-Protein kann sowohl in seiner Wildtyp-Form als auch in seiner mutierten Form mittels p53- Antikörpern immunhistochemisch dargestellt werden.

Dieses Verfahren ist bereits an einer großen Zahl unterschiedlicher Tumoren erprobt und erfolgreich durchgeführt. Die positive Kernfärbung der Mehrheit der Tumorzellen bei gleichzeitiger Negativität der umgebenden Gewebe ist ein häufiges Färbemuster, dass für eine „missense mutation“ des p53-Gens charakteristisch ist<sup>82</sup>.

Zahlreiche Studien belegen eine signifikante Korrelation zwischen einer Überexpression des p53-Proteins und einer Mutation des codierenden Gens bzw. einer 17p13.1-Deletion<sup>90</sup>, was die Aussagekraft dieses immunhistochemischen Verfahrens nochmals unterstreicht.

Der Nachweis von P53-Mutationen, nahezu unabhängig von der Art des Tumorgleichsames, gilt als sehr ungünstiger prognostischer Marker bezüglich der Aggressivität des Tumors und der Überlebenschance des Patienten<sup>53,79,106,116,146,172,182,188,204,215,222,226</sup>. In dieser klinischen Studie konnte diese Tatsache wiederum bestätigt werden.



Von 134 untersuchten Übergangszellenkarzinomen der Harnblase konnte bei 118 Tumorpatienten eine P53-Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Studien, die einen Anteil an P53-positiven Tumoren zwischen 40 und 70% gefunden haben<sup>165,167,203,237</sup>. Somit ist die Auftretshäufigkeit der Tumor-Marker (P53) in den oberflächlichen Urothelkarzinomen der Blase als bedeutsam nachgewiesen.

Bei den 118 Patienten mit nachweisbarem Tumor-Marker (P53 +), sind bei 57 Patienten Tumorrezidive und bei 61 Patienten eine Rezidivfreiheit festgestellt worden. Somit konnte im Gegensatz zu zahlreichen Studien, die einen Zusammenhang zwischen P53-Expression und Tumorrezidiv bestätigten, keine kennzeichnende Korrelation zwischen Rezidivhäufigkeit und P53-Positivität festgestellt werden, wie auch wenige Autoren, die zu derselben Schlussfolgerung kamen<sup>2,218</sup>.

Als ein wichtiges Ergebnis dieser Studie kann die typische Korrelation zwischen Rezidivrate und Infiltrationsstadium sowie Malignitätsgrad des Tumors bei P53-Expression diagnostiziert werden. Somit kann die Aussage, je höher das Tumor-Stadium und das Tumor-Grading, um so häufiger das Rezidiv, belegt werden. Dies steht im Einklang mit der Aussage der Studie<sup>219</sup>, dass eine P53-Mutation nach immunhistochemischer Analyse mit höherem Tumorstadium und Tumorigrad und der Prognose der Krankheit wie der Rezidivhäufigkeit korreliert.

Über den Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der P53-Expression und der Rezidivhäufigkeit wurden bis heute kaum Studien publiziert. Diese klinische Arbeit untersuchte neu jeden einzelnen pathologisch-anatomischen Befund der vorbehandelten primären Urothelkarzinome der Blase und die Operationpräparate in der Pathologie des Krankenhauses Bogenhausen in München. Es wurden an repräsentativen Gewebsstücken der prozentuale Anteil der P53 bestimmt. Das wichtigste Ergebnis dieser Studie ist, dass mit zunehmendem prozentualen Anteil der P53-Expression die Rezidivrate nicht kontinuierlich zunimmt.

Ein weiterer Teil dieser Studie eruierte einen möglichen Zusammenhang zwischen BCG/Mitomycin-Therapie und der Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit P53-Expression (Positivität). Bei dem aus 134 Personen bestehenden Patientenkollektiv ist bei 118 Patienten der Tumor-Marker p53 nachweisbar. 57 dieser Patienten haben ein Tumorrezidiv und 61 sind rezidivfrei. Von den 57 Patienten (mit Positivität der Tumormarker und Rezidiv) hatten 24 Personen eine Behandlung. Von den 61 rezidivfreien Patienten wurden 28 behandelt. Wie es in den wenigen Veröffentlichungen bestätigt wurde<sup>219,206</sup> konnte keine signifikante Korrelation zwischen P53-Status und der BCG/Mitomycin-Therapie belegt werden. Das Resultat, gefunden von Fontana et al., dass eine BCG-Therapie unter Umständen die Expression von P53 in Urothelkarzinomen senken kann<sup>196</sup>, konnten wir somit nicht bestätigen.

Angaben zum Verlauf der Erkrankung wurden durch Nachuntersuchungen des Patientenkollektivs gewonnen und ergeben entsprechend der Jahrgänge der Operationspräparate einen Überwachungszeitraum von acht Jahren. Insbesondere wurden hier die häufigsten Risikofaktoren wie z.B. Rauchen und Alkohol und die Nebendiagnosen Diabetes mellitus, obstruktive Lungen-Erkrankung und andere Malignome in der Anamnese beobachtet. Dass das Blasenkarzinom in seiner Pathogenese eng mit der Einwirkung chemischer Karzinogene aus der Umwelt zusammenhängt und durch zivilisationsbedingtes Verhalten (Rauchen) provoziert wird, steht schon seit den früheren siebziger Jahren fest<sup>42</sup>.

Interessant ist hier der Zusammenhang zwischen Rezidivhäufigkeit und Rauchen / Alkohol als Risikofaktor.

Untersucht wurde in unserer Studie das Risiko "Alkoholkonsum" zusätzlich zum Nikotinkonsum, um eine Korrelation dieses Risikos mit Urothelkarzinom festzustellen.

Nach unseren klinischen Erfahrungen ist am Ehesten die beobachtete Häufung von Blasentumoren bei C2-Abusus durch gleichzeitiges Rauchen zu erklären.

In dieser Studie wurde festgehalten, dass 42 Patienten rauchen bzw. geraucht haben oder geraucht und Alkohol getrunken haben. Dabei wurde bei 26 Patienten ein Tumorrezidiv festgestellt und 16 Patienten waren rezidivfrei.

Bei 69 Patienten mit Alkohol- und Tabakkonsum konnte festgestellt werden, dass 37 Patienten Rezidivfreiheit und 32 Patienten ein Tumorrezidiv vorweisen. Somit konnte keine bezeichnende Abhängigkeit zwischen Rauchen/Alkohol als Haupt-Risikofaktoren mit der Rezidivhäufigkeit des Tumors bei den Tumorkranken abgeleitet werden. Diese Aussage wird zugleich durch andere Studien unterstrichen, dass bei betroffenen Patienten mit einer P53-Mutation eine Anhäufung von Rauchern nicht objektiv darstellbar ist. (Beziehung zwischen Schadstoffexposition, Fremdstoffbiotransformation u. Mutation Im P53-Tumor-Suppressor-Gen beim Harnstoff 1998).

## 5. Zusammenfassung

---

Das Tumor-Suppressor-Protein P53 spielt eine zentrale Rolle bei der Sicherung der Genom-Integrität und sein Funktionsverlust begünstigt die maligne Zellproliferation und damit die Tumorentstehung. Die P53-Mutation verursacht eine Instabilität der Zell-Zyklus-Kinetik und führt zu einer Anhäufung der veränderten Genprodukte im Zellkern und ist in Zusammenhang mit Harnblasenkarzinom ein häufig anzutreffendes Ereignis. In dieser klinischen Studie wurden 134 oberflächliche Urothelkarzinome der Tumor-Stage PTa, PT1 und pTis mit unterschiedlichem Malignitätsgrad auf eine mögliche P53-Expression mit dem bewerteten prozentualen Anteil hin untersucht.

Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Daten mit histopathologischen Parametern sowie Rezidivhäufigkeit des Tumors und BCG/Mitomycin-Therapie sowie auch Risikofaktoren miteinander korreliert. Angaben zum Verlauf der Erkrankung wurden durch Nachuntersuchungen des Patientenkollektivs gewonnen.

Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil der P53-Expression bei den Tumorpatienten einerseits und der Tumor-Stage und -Grade, Effektivität der BCG/Mitomycin-Therapie, Rolle der häufig vorgekommenen Risikofaktoren andererseits nachzuweisen sowie den prognostischen Nutzen in Bezug auf Rezidivwahrscheinlichkeit.

Eine mögliche P53-Expression wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen. Die Tumore wurden anhand der Quantität der gefärbten Zellkerne in Bezug auf P53 in vier Gruppen untergliedert:

- 1) P53=0=negativ „kein Tumorzellkern gefärbt“
- 2) P53 <20% „weniger als 20% der Tumorzellkerne gefärbt“
- 3) P53 20%<=40% „von 20% bis 40% der Tumorzellkerne gefärbt“
- 4) P53 >40% „mehr als 40% der Tumorzellkerne gefärbt“

Bei 118 Patienten von insgesamt 134 Tumorpatienten wurde eine P53-Expression nachgewiesen. Somit ist die Auftrittshäufigkeit des Tumor-Marker P53 im Übergangszellkarzinom der Blase eindeutig festgestellt. Von 118 Patienten mit P53-Positivität sind bei 57 Patienten Tumorrezidive nachweisbar und 61 Patienten sind Rezidivfrei. Es besteht somit kein Zusammenhang zwischen P53-Expression und Rezidivwahrscheinlichkeit.

Einen weiteren interessanten Aspekt bietet das Ergebnis aus der Korrelation zwischen Rezidivhäufigkeit und Tumor-Stage und -Grade bei P53-positiven Patienten. Da, von diesen 118 untersuchten Patienten mit P53+, 62 Personen das Tumorstadium PTaG1 (davon 35 Patienten mit Tumorrezidive), 33 Patienten das Tumorstadium PTaG2 (davon 9 Personen mit Tumorrezidive), 23 Patienten das Tumorstadium PTaG3 bis PT1G4 (inklusive zwei Fälle kombiniert mit Cis-stadium, von denen wiederum 13 Patienten Rezidive haben) aufwiesen, ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen Rezidivrate und Tumor-Stage und -Grade bei P53-Expression (Positivität) festzustellen. Somit kann die charakteristische Aussage, je höher die Tumor-stage und -grade bei den Patienten mit P53-Expression desto höher die Rezidivwahrscheinlichkeit, getroffen werden.  $P=0,0173$

Weiterhin konnte nach der Einteilung der 118 Patienten in vier Gruppen auf Basis nachgewiesenem prozentualen Anteil der P53-Expression im Tumormaterial leider keine kennzeichnende Korrelation mit der Rezidivhäufigkeit festgestellt werden. Was zur der Schlussfolgerung führt, dass mit zunehmendem Anteil an P53-Expression in den Tumorgeweben der oberflächlichen Urothelkarzinome der Blase die Rezidivrate nicht proportional zunimmt.

Von 57 Patienten mit P53(Positivität) und vorhandenen Tumorrezidiven wurden 24 Patienten (20 Patienten mit BCG und 4 Patienten mit Mitomycin) therapiert. Von den 61 Patienten mit ebenso P53(Positivität) aber mit Rezidivfreiheit sind 28 Patienten (20 Patienten mit BCG und 8 Patienten mit Mitomycin) behandelt worden. Schlussfolgernd kann man postulieren, dass eine signifikante Abhängigkeit der Rezidivhäufigkeit bei P53-Expression von der BCG/Mitomycin-Therapie nicht festzustellen ist.  $P=0,6781$

Im Anschluss wurde angestrebt, anhand der nennenswerten Anzahl an Patienten (111 Patienten mit Risikofaktoren), die geraucht und/oder Alkohol getrunken haben, eine Korrelation mit der Rezidivrate nachzuweisen. Nach unseren Daten hatten 26 Patienten der 42 Raucher und 37 Patienten der 69 Alkoholiker Tumorrezidive. Nach unserer statistischen Analyse haben wir die Schlussfolgerung gezogen, dass ein Zusammenhang zwischen Rauchen/Alkohol als Risikofaktoren und der Rezidivhäufigkeit ebenso nicht feststellbar ist.

Von den restlichen 16 Patienten, bei denen kein Tumor-Marker (P53) nachweisbar war (P53=0=negativ), sind 12 Patienten rezidivfrei und 4 Patienten weisen Tumorrezidive nach. Somit kann bestätigt werden, dass der fehlende Nachweis von Tumor-Suppressor-Protein P53 in dem Tumormaterial den höchsten Anteil an Rezidivfreiheit verspricht und bessere Chancen auf eine bessere Prognose bestätigt.

Auch hier bei 16 P53-negativen Patienten (davon 12 rezidivfrei) sind 2 Patienten mit BCG therapiert worden und einer von 4 tumorrezidiven Patienten hatte eine BCG-Therapie beansprucht. So konnte keine Korrelation zwischen Rezidivwahrscheinlichkeit und BCG-Therapie auch bei Patienten ohne den nachweisbaren Tumor-Marker P53 festgestellt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass bei der P53-Expression als Zeichen einer Gen-Mutation eine fortgeschrittene Infiltration als auch eine zunehmende Entdifferenzierung des Urothelkarzinoms mit der Rezidivrate positiv korreliert. Aus der signifikanten und nachweisbaren Auftretshäufigkeit des Tumor-Suppressor-Proteins P53 in dem Übergangszellkarzinom der Blase und der nachgewiesenen positiven Korrelation zwischen Tumor-Stage und –Grade mit der Rezidivhäufigkeit und der Tatsache, dass die BCG/Mitomycin-Therapie mit der Rezidivrate nicht korreliert, kann man einen effizienten Nutzen bei der Auswahl eines adäquaten Therapieverfahrens insbesondere in der Gruppe häufig rezidivierender PTa/PT1-Karzinome ziehen. Dass der prozentuale Anteil der P53 mit der Rezidivhäufigkeit nicht korreliert, bestreitet aber nicht die schlechte Prognose der P53-Überexpression in den fortgeschrittenen Tumorstadien. Die Tatsache, dass die Tumorpatienten ohne nachweisbaren P53-Marker den höchsten Anteil an Rezidivfreiheit zeigen, lässt die Beurteilung der Tumorprognose auf eine möglichst breite Basis stellen, was die ärztliche Therapieentscheidung mit ihren weitreichenden Konsequenzen für die Lebensqualität des Patienten erheblich erleichtern könnte.

## 6. Literature-Verzeichnis

---

- 1 Abel et al.
- 2 Abi Aad AS, New generation of prognostic factors in muscle-invasiv bladder cancer. Acta Urol. Belg.64(2):47-9,1996
- 3 Ackermann D., Biedermann C, Bailly G., Studer U.E.: Treatment of superficial bladdermors within travesicalre combinant in terferoal pha2a. Urol.Int.43:85-88(1988)
- 4 Agarwal et.al.,1995
- 5 Anderson M.W., Maronpot R.R. and Reynolds S.H.(1988): Role of oncogenes in chemical carcino genesis: Extrapolation from rodentsto humans.In: Methods for Decting DNA Damaging Agents in Humans: Applications in Cancer Epidermilog and Prevention .Bartsch H.,
- 6 Augustine(1988)
- 7 Badalment R.A., Ortolano V., Burgers J.K: Recurrent or aggressive bladder cancer: indications for adjuvant intravesical therapy. Urol.Clin.NorthAm.19:485-498(1992)
- 8 Baker et al., 1989
- 9 Baker et al., 1990
- 10 Barak et al., 1993
- 11 Barbacid, 1986
- 12 Barbacid, 1987
- 13 Bargonette et.al., 1991
- 14 Barnes D.M., Hanby A.M., GilletC.E., Mohammed S.,Hodgson S., Bobrow L.G., Leighl M., Parkis T., Mac Geoch C., SpurtN K. : Abo normal expression of wild type p53 protein innormal cells of a cancer family patient. Lancet.340259-63(1992)
- 15 Barnes et.al.1977a
- 16 Barnes et.al.1977b
- 17 Batata M.A., WhitmoreW.F.Jr., ChuF.C.HilarisB.S., Unal.A.ChungS. : Patterns of recurrence in bladder cancer treated by irradiotion and /orcystectomy.Int.J.Rad.,Oncol.Biol.,Phys.6:155-162(1980)
- 18 Baudier et.al., 1992
- 19 Beer D.G. and Pito H.C.(1988) Proto-oncogene activation during chemically in duced hepato carcino geninrodents. Mutat.Res.220:1-10.
- 20 Binder R.A., A.Schmamann: Bilharziasis and squamous Karzinoma of the bladder
- 21 Bishop, 1985
- 22 Bishop, 1986
- 23 Bjelogrljic et.al., 1994
- 24 Bladder cancerin relation to cigarette smoking.
- 25 Böhle et.al.1990
- 26 Bookstein, R, Allred, DC: Recessive oncogenes. Cancer 71(1993): 1179-1186
- 27 Boring CC, Sqires TS, Tong T. Cancer statistics, 1993. CA Cancer J Clin 43:7-26,1993
- 28 Brosman S.A., LammD.L. :Thepparation, handling and use of intravesical bacillus Calmett-Guerin for the management of stage Ta,T1,Karzinoma in situ and transitional cell cancer, J.Urol.144:315-5(1990)
- 29 Burck K.B., Liu E.T. and Larrick,J.W.(1988) Oncogenes-Anintroduction to the concept of cancer genes. Springer-Verlag,Berlin.
- 30 Burkart C. Das Tumor suppressor protein p53. Deutsches Ärzteblatt 91(13):679-684,1994
- 31 Cancer Re.48(1988)4405-4408
- 32 Cardiff et.al., 1988
- 33 Cartwright R.A., R.W. Glashan, J.R. Robers, R.A. Ahmadi, D. Barham-Hall, E. Higgins, M.A.Kahn: (1982)

- 34 Case R.A.M., M.E. Hosler, D.B. Mc Donald, J.T. Pearson : Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in them anifacture and use of certaindye stuffinter mediates in the British chemical industry Brit. J.Industr.Med.11(1954)75
- 35 Casey et.al., 1991
- 36 Cesarman et.al., 1987
- 37 Chang et.al., 1995
- 38 Chen et.al., 1990
- 39 Cho et.al., 1994
- 40 Clavel J.S.Cordier, L.Boccon, Gibodet.A.I.: Tobacco and bladder cancer in males, increased risk for inhalers and smokers of black tobacco, Int.J.Cancer44(1989)605-610
- 41 Cohen SM, Johansson SI. Epidemiology and etiology of bladder cancer . Urol Clin North Am 19:421-428,1992
- 42 Cole 1974
- 43 Cole PI, R.B.Manson, H.Haning, G.H.Fiedelt: Smoking and cancer of the lower urinary tract. N.Engl.J.Med.284(1971),129-134
- 44 Conolly,J.G.,W.D.Rider,L.Rosenbaum: Relation between the use of artificial sweeteners and bladder cancer. Ca.Med.Assoc.J.119(1978)408
- 45 Cooper, 1990
- 46 D'Avanzo B., E.Negrie, C.LaVecchia, A.Gramenzi, C.Bianchi, S.Franceschi, P.Boyle: Cigarettes smoking and bladder cancer. Eur.J.Cancer26(1990)714-718
- 47 De Jager R., Guinan P., LammD., KhannaO., BrosmanS., DeKernionJ.,WilliamsR.,RichardsonC.,MuenzL.,ReitsmaD.:Longterm complete remission in bladder Karzinoma in situ within travesical TICE bacillus Calmette Guerin, Overview analysis of sixphasell clinical t
- 48 DeLeo et.al., 1979
- 49 Denissenko et.al., 1996
- 50 Di Leonardo et.al.,1994
- 51 Diller et.al., 1990
- 52 Dolan et.al., 1994
- 53 Dowell & Hall, 1994;
- 54 Duncan RE, Bennet DW, Evans AT, Arow BS, Schellhas R. Radiation induced bladder tumor. J Urol 118: 43-45, 1977
- 55 El-Deiry et.al., 1992
- 56 El-Deiry et.al., 1993
- 57 El-Deiry, 1996
- 58 Eliyahu et.al., 1984
- 59 Eliyahu et.al., 1988
- 60 Enoch & Norbury, 1995
- 61 Evan, 1986
- 62 Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD, Gangai MP, The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. J Urol 122:163-167, 1979
- 63 Farmer et.al., 1992
- 64 Fields & Jang, 1990
- 65 Finlay et.al., 1988
- 66 Fokkens,W.: Phenacetinabuse releated to bladder cancer. Environ,Res.20(1979), 192
- 67 Ford & Hanawalt, 1997
- 68 Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, etal. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. Cancer Res 52:1393-1398, 1992
- 69 Funk et.al., 1992
- 70 Gao,H.-G., Chen,J.K., Stewart,J., Song,B., Rayappa,C., Whong,W.Z.,and Ong,T.(1997) Distribution of p53 Cooper,C.S. and Grover,P.L.(1990) Chemical Carcino genesis and MutagenesisI an dII. Springer-Verlag,Berlin.
- 71 Gerwin et.al., 1982
- 72 Ginsberg et.al., 1991

- 73 Glashan R.W.: Arandomized controlled study of intravesical alpha-2-interferonin Karzinoma in situ of the bladder. J.Urol.144:658-61(1990)
- 74 Glover,D.M. and Hames B.D.(1989) On cogenes. Oxford University Press, Oxford.
- 75 Greenblatt et al., 1994
- 76 Gronostajski et.al., 1984
- 77 Guilouf et.al.,1995
- 78 Hall et.al., 1983
- 79 Hamelin et.al.,1994;
- 80 Harlow et.al.,1985
- 81 Harper et.al.,1993
- 82 Harris & Hollstein; 1993
- 83 Harris,1996
- 84 Hartwell & Kastan,1995
- 85 Heichman & Roberts,1994
- 86 Herr H.W., LaudoneV.P., BadalamentR.A.: Bacillus Calmette Guerin therapyalters the progression of superficial bladder cancer. J.Clin.Oncol.6:1450-1455(1988)
- 87 Herr HW intravesical BCG: current results, ratural history and implication or urothelial cancer prevention. J Cell Biochem Suppl 161:112-119, 1992
- 88 Herr HW, Laudone VP, Badalament RA, et al. Bacillus Calmette Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. J Clin Oncol6:1450-1455, 1988
- 89 Hicks R.M., J.Chownaic: The importance of synergy between weak carcinogens in the induction of bladder cancer in experimental animals and humans. CancerRes.37(1977)2943
- 90 Hicks R.M.: Multi stage carcino genesis in the urinary bladder. Br.med.Bull.36:39-46(1980)
- 91 Hinder und Schmamann, 1969
- 92 Hinds et.al.,1989
- 93 Hollstein et.al.,1991
- 94 Hollstein et.al.,1996
- 95 Imai et.al.,1996
- 96 Imai Z., Oda H., Arai M., Shimizu S., Nakatsuru Y., Tohru I.and Takatoshi I.(1986) Mutational analysis of the p53 and K-rasgenes and allelo type study of the Rb-1gene for investigating the pathogenesis of combined hepatocellular-cholangiocellular Karzinom
- 97 Isobe et.al.,1986
- 98 Jacobi G.H., J.E.Altwein: Divertikeltumoren der Harnblase .Akt.Urol.11(1977)234
- 99 Jacobi G.H.Jacobi-Hermanns.E., AltweinJ.E.: Prognose des Harnblasen karzinoms. Georg Thieme Verlag, Stuttgart(1979)
- 100 Jacobi und Altwein 1972
- 101 Jakse G.: BCG for Karzinomainsitu .Eur.Urol.21Suppl.2:30-4(1992)
- 102 Jaske g, fritsch E, Frommhold H. Comination of chemotherapy and irradiation for non resektable bladder carcinoma. Word J Urol 3:121-125,1985
- 103 Jaske g, Rauschmaier H, Fritsch E, Fromhold H, Marberger H. Die integrierte Radiotherapie und Chemotherapie des lokal fortgeschrittene Harnblasencarciom. Act Urol 17:68-73,1986
- 104 Jayaraman & Prives,1985
- 105 Jenkins et.al.,1984
- 106 Kakeji et.al.,1993
- 107 kakizoe T, Fujita J, Murase T, Mastumoto K, Kishi K. Transitional cell carcinoma of the bladder in patients with renal pelvic and ureteral cancer. J Urol 124:17-19,1980
- 108 Kälble T., Mobring K., Ikinge U., Riedasch G., Staehler G.: (Intravesical prevention of recurrence of superficial urinary bladder cancer with BCG and KLH. Alprospective randomized study) (Intrave sikkale Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasen

- 109 Kastan et.al.,1991
- 110 Kern et.al.,1991
- 111 Khan et.al.,1997
- 112 Khanna & Lavin,1993
- 113 Kiemeny AJ, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AI, Debruyne FM. Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. J Urol 150:60-64,1993
- 114 King et.al.,1994;
- 115 Klein & Klein,1984
- 116 Kovach et.al.,1995
- 117 Kovach et.al.,1996
- 118 Kure et.al.,1996;
- 119 Kurth K.H.: Superficial TCC bladder cancer: the impact of tumor differentiation on recurrence, progression and survival Prog. Clin.Biol.Res.162A:307-18(1984)
- 120 Lamm D.L., DeHaven J.I., Riggs D.R., Ebert R.F.: Immunotherapy of murine bladder cancer with keyhole limpet hemocyanin (KHL), J.Urol.149:648-52(1993)
- 121 Lamm D.L.: Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. Urol.Clin.North.Am.19:565-72(1992b)
- 122 Lamm D.L.: Karzinom in situ. Urol.Clin.North.Am.19:499-508(1992a)
- 123 Lamm D.L.: Prophylaxis for recurrent transitional cell carcinoma. Urology 37:21-3(1991)
- 124 Lancet 2 (1982) 842-846
- 125 Lande & Crawford,1979
- 126 Lane et.al.1994
- 127 Lane,1992
- 128 Lee et.al.,1995
- 129 Lehman et.al.,1994
- 130 Lerner SP, Skinner E, Skinner DG. Radical cystectomy in regionally advanced bladder cancer. Urol Clin North Am 19:713-723, 1992
- 131 Levine & Momand: Transitional cell carcinoma of the bladder. J.Urol.149:957-972(1993),1990
- 132 Levine A.J. and Momand J. (1980) Tumor suppressor genes: The p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. Biochim.Biophys.Acta 1032:119-136.
- 133 Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. Nature 351:453-456, 1991
- 134 Levine et.al.,1995
- 135 Levine,1983
- 136 Levine,1997
- 137 Li R. et.al.,1995
- 138 Linzer & Levine,1979
- 139 Lorenz et.al.,1994
- 140 Lowe et.al.,1993;
- 141 Lower 1982
- 142 Lower G.M., G.T. Bryan: Enzymatic N-acetylation of carcinogenic amines by liver cytosol of species displaying different organ susceptibilities. Biochem.Pharmacol.22(1973)1581-1588
- 143 Maltzman & Czyzyk,1984
- 144 Marshall et.al.,1984
- 145 Marx,1994
- 146 Mazares et.al.,1992,
- 147 McKay et.al.,1997
- 148 Meek & Eckhart,1988
- 149 Melekos et.al.1993



- 150 Melekos M.D., Chionia H., Pantazakos A., Fokaefs E., Paranychianakis G., Dauaher H.: Intravesical bacillus Calmette-Guerin immunoprophylaxis of superficial bladder cancer: results of a controlled prospective trial with modified treatment schedule J.,Urol.1
- 151 Mercer et.al.,1990
- 152 Miller et.al.,1986
- 153 Milne et.al.,1995
- 154 Milner & Medcalf, 1991
- 155 Mitsudomi et.al.,1994
- 156 Miyashita & Reed, 1995
- 157 Molto L.M., Carballido J., Jurinic C., Lapena P., Manzano L., Salmeron I. Klippel K.F., AlvarzeMon M.: Keyholelimpe themocyaninecan enhance the natural killer activity of patients with transitional cell Karzinoma of the bladder. Eur.Urol.19:74-8(1991)
- 158 Mora et.al.,1980
- 159 Morrison A.S., J.E. Bruing: Artificial sweeteners and cancer of the lower urinary tract. N.Eng.J.Med.302(1980)537
- 160 Morrison, 1980
- 161 Morrision A.S.: Advances in the etiology of urothelial cancer. Urol.Clin.NorthAm.11(1984)557
- 162 Müller et.al.,1997
- 163 Nelson & Kastan,1994
- 164 Nigro et.al.,1989
- 165 Offner FA, Schäfer G, Hittmair A, Öfner D, Grünwald K, Weyrer K, Mattern D, Eberle J, Mikuz G, Feichtinger H.. Proliferative activity and p53 expression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Verh Dtsch Ges Path 77: 241-246, 1993
- 166 Okamoto & Beach 1994
- 167 Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI, Jones PA. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high gradetransitional call carcinomas of the bladder cancer Res 50: 7081-7083, 1990
- 168 Oren & Levine,1983
- 169 Oren et.al.,1981
- 170 Oren et.al.,1982
- 171 Oren et.al.,1983
- 172 Otto T., al-Enzawi S., Ruebben H.: Therapeutic strategies in patients with bladder tumors according to his to pathological findings. Verh.Dtsch.Ges.Pathol.77:199-203(1993)
- 173 Pagano et.al,1991
- 174 Parada et.al.,1984
- 175 Parkes H.G.: Theepidemiologyofthearomaticamincancers.ACS(Am.Chem.Soc.)Monogr.173(1976)462
- 176 Price J.M., C.G. Biava, B.L. Oser, E.E. Vogina, J.Steinfeld, H.L. Ley: Bladder tumours in ratsfed cyclohexy lamine or high doses of mixture of cyclamate and saccharin.Science167(1970)1131-1132
- 177 Rämets,1995
- 178 Raycroft et.al.,1990
- 179 Rayter et.al.,1989
- 180 Reghavan D, Shipley WU, Garnick MB, Russel PJ, Richie JP. Biology and managment of bladder cancer. N Eng J Med 322: 1129-1138, 1990
- 181 Reich & Levine,1984
- 182 Remviskos et.al.,1992
- 183 Reynolds et.al.,1991
- 184 Roehrborn C.G., Sagalowsky A.I., Peters P.C.: Longterm patient survival after cystectomy for regional metastatic transitional cell Karzinoma of the bladder.J.Urol.146:36-39(1991)
- 185 Roehrborn et.al.1991
- 186 Roleof N- aceyl transfer as epheno types in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetice pidemiological approach to bladder cancer.

- 187 Roots I., N.Drakoulis, J.Bockmüller: Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts methodology and data review. W.Kalow(ed), Pharmacogenetics of Drug Metabolism New York; Pergamon Press(1992)815-841
- 188 Rosen et.al.,1995
- 189 Rous & Murphy , 1911
- 190 Rovinsky et.al.,1987
- 191 Rozanski T.A., Grosman H.B.: Recent developments in the pathophysiology of bladder cancer. AJR Am.J. Roentgenol. 163:789-792 (1994)
- 192 Rozanski und Grossmann, 1994
- 193 Rübben und Oacham, 1991
- 194 Ruebben H., Jocham D.: Therapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. Urologe(A)30:2-9 (1991)
- 195 Ruebben H., Lutzeyer W., Fischer N., Deutz F., Lagrange W., Giani G.: Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors. J.Urol.139:283-285(1988)
- 196 Sargent E.R., Williams R.D.: Immuno therapeutic alternatives in superficial bladder cancer, Interferon, interleukin-2, and keyhole-limpethemo cyanin. Urol.Clin.North.Am.19:581-9(1992)
- 197 Sarnow et.al.,1982
- 198 Schwab,1985
- 199 Shaw et.al.,1992
- 200 Shaw et.al.,1996
- 201 Sheikhetal.,1994
- 202 Shin et.al.,1995
- 203 Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. Science 25:705-709,1991
- 204 Sidransky et. al.,1992
- 205 Smith & Fornace,1996
- 206 SMITH, NORM D.; RUBENSTEIN, JONATHAN N.; EGGNER, SCOTT E.; KOZLOWSKI, JAMES M.The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer: The journal of urology: Volume 169(4) April 2003 pp 1
- 207 Sökeland J, Harnblasentumoren. In: Sökeland J: Urologie , 11, Neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, New York: 236, 1993
- 208 Soloway M.S.: The management of superficial bladder cancer.In: Javadpour N.(Hrsg.): Principles and management of urologic cancer, Williams & Williams, Baltimore, pp:446(1983)
- 209 Soussi et.al.,1987
- 210 Stadler WM. Molecular events in the initiation and progression of bladder cancer. Int J Oncol 3:549-557, 1993
- 211 Stenger et. al.,1992
- 212 Stewart et.al.,1995
- 213 Stöckle M., Alken P., Engelmann U., Jacobi G.H., Riedmueller H., Hohenfellner R.: Radikale Zystektomie- Oft zu spät? Akt.Urol.17:234-239 (1986)
- 214 Strech et.al.,1991;
- 215 Tabin C.J., Bradley S.M., Bargman C.J., Weinberg R.A., Papageorge G.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy Dr.R. and Chang E.H.(1982) Mechanismen of activation of a human oncogene. Nature 300:143149.
- 216 Takashashi et.al.,1989
- 217 Takenaka et.al.,1995

- 218 Tetu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P, Prevalence and clinical significance of HER2/neu, p53 and RB expression superficial bladder cancer. J Urol155(5) : 1784-8, 1996
- 219 The journal of urology April 2003,
- 220 Trasher J.B., Crawford E.D.: Current management of invasive and metastatic cancer
- 221 Trasher und Crawford, 1993
- 222 Uhlman et.al.,1994
- 223 Vamus, 1989
- 224 Van den Berg et.al., 1993
- 225 Vann Rijswijk, REN: Der Prozess der Karzinogenese. Sanorama 1 (1994): 4-12
- 226 Velculescu & El-Deiry, 1996
- 227 Venkatachalam et.al., 1997
- 228 Vineis PI, L. Simonato: Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systemic approach. Arch. Environ, Health 46,1(1991)6-15
- 229 Vogelstein & Kinzler, 1992b
- 230 Vogelstein, 1990
- 231 Vousden et.al., 1986
- 232 Werness et.al., 1990
- 233 Wiethage et.al., 1994
- 234 Wiethage T., Voss B. and Müller K.-M.(1994): Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene beider Pathogenese von Lungentumoren. Pathologie15:321-330.
- 235 Wolf, JM, Habib FK, : Tumor suppressor genes in urologic tumors. Urology 42 (1993): 461-467
- 236 Wolterbeek et.al.,1995
- 237 Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AC, Horne CH, Neal DE, Expression of mutant p53 , c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder . Br J Cancer 63: 967-970,1991
- 238 Wynder EL, Goldsmith R. The epidemiology of bladder cancer : a second look. Cancer 40: 1246-1268, 1977
- 239 Xiong et.al.,1993
- 240 Yang et.al.,1995
- 241 Yew & Berk, 1992
- 242 Yonish-Rouach et.al., 1993
- 243 Yuan et.al., 1995
- 244 Zakut-Houri et.al., 1983
- 245 Zambetti et.al., 1992
- 246 Zingg et.al.

Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde durch die freundliche Unterstützung vom Herrn Dr. Helmut Exner angefertigt.

(Medizinische Biometrie der Ludwig-Maximilian Universität München)

Literatur: Exner H., Medizinische Biometrie, GK2, 13. Auflage 2002, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York

## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Saleh Birjandi  
Vorname: Ramana  
Geburtsdatum/ Ort: 17.02.1970 in Shiraz / Persien  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Perserin  
Adresse: Saarlouiser Str. 18 a, 80997 München  
Tel: 089 14883724

### Schul Ausbildung und beruflicher Werdegang

1976-1981.1	Grundschule, Teheran
1981-1983	Mittelschule, Teheran
1983-1987	Gymnasium, Abitur (Naturwissenschaft), Teheran
1987-1990	Universität Teheran, Fachrichtung Englisch
1/1991	Einreise nach Deutschland (München) zum Studium
1991	Sprachkurs Deutsch, Inlingua Institut München
1992	Studienkolleg München
SS 1993	Beginn des Medizinstudiums an der LMU-München
WS 2002	2. Staatsexamen
SS 2003	3. Staatsexamen (22.5.03)
23.11.2003	Beginn als ÄIP an der Frauenklinik Dr. Krüsmann München
ab 01.10.2004	Assistenzärztin (Vollzeit) an der Frauenklinik Dr. Krüsmann München

### Sprachkenntnisse

Englisch, Deutsch, Persisch